



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

---

---

**“EFECTO ANTIGENOTÓXICO DE LA CÁSCARA DE  
GRANADA (*Punica granatum* L.) CONTRA EL DAÑO  
PRODUCIDO POR LA DOXORRUBICINA EN RATÓN  
CD1+”**

Tesis que para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS Y DE LA SALUD**

Presenta:

**MA. ISABEL SÁNCHEZ CRISÓSTOMO**

Directora de Tesis

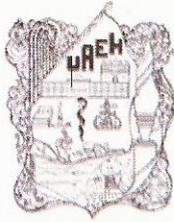
**DRA. RAQUEL CARIÑO CORTÉS**

Codirectores

**DR. GABRIEL BETANZOS CABRERA  
DR JOSÉ DE JESÚS MANRÍQUEZ TORRES**

San Agustín Tlaxiaca Hgo. a 7 de noviembre de 2015





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO  
 Instituto de Ciencias de la Salud  
 School of Health Sciences  
 Área Académica de Medicina  
 Department of Medicine  
 Maestría en Ciencias Biomédicas y de la Salud

14 de octubre de 2015  
 AAM/MCBS/120/2015

Asunto: Acta de impresión

Lic. Ma. Isabel Sánchez Crisóstomo  
 Candidata a Maestra en Ciencias Biomédicas y de la Salud

Por este conducto le comunico el jurado que fue asignado a su Tesis titulada, "Efecto antigenotóxico de la cáscara de granada (*Punica granatum* L.) contra el daño producido por la doxorubicina en ratón CD1+" con el cual obtendrá el **Grado de Maestra en Ciencias Biomédicas y de la Salud**; después de revisar la tesis y haber realizado las correcciones acordadas, el jurado seleccionado ha decidido autorizar la impresión de la misma.

A continuación se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del jurado:

PRESIDENTE DOCTOR GABRIEL BETANZOS CABRERA

PRIMER VOCAL DOCTORA. RAQUEL CARIÑO CORTÉS

SECRETARIO DOCTOR JOSÉ DE JESÚS MANRÍQUEZ TORRES

SUPLENTE DOCTOR TOMAS EDUARDO FERNÁNDEZ MARTÍNEZ

SUPLENTE DOCTOR MANUEL SÁNCHEZ GUTIÉRREZ

Reciba un cordial saludo.

Atentamente  
 "AMOR, ORDEN Y PROGRESO"

MÉDICO CIRUJANO JOSÉ MARÍA BUSTO VILLARREAL  
 DIRECTOR

DOCTORA ARACELI ORTIZ POLO  
 COORDINADORA DE POSGRADO ICSA

DOCTOR JUAN ELIEZER ZAMARRIPA CALDERÓN  
 COORDINADOR DEL PROGRAMA

JEZC\*



Laboratorio de Materiales Dentales /Ciudad del Conocimiento  
 Carretera Pachuca Tulancingo Km 4.5  
 Mineral de la Reforma, Hidalgo, México C.P. 42184  
 Teléfono: 52 (771) 71 720 00 Ext. 6931  
 mtria\_bio\_sal@uaeh.edu.mx

[www.uaeh.edu.mx](http://www.uaeh.edu.mx)

Durante el desarrollo de estos estudios, se contó con una beca de manutención otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), número de beca 295287.

El trabajo de investigación se llevó a cabo en los laboratorios de Toxicología, Nutrigenómica, Farmacia y de Alimentos Funcionales y Nutracéuticos del Instituto de Ciencias de la Salud y en el laboratorio de Química del Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

*A mis hijitos, Ricardo, Benja y  
Vale quienes sin saberlo han  
hecho que este logro sea posible...*

*A mis padres por su gran apoyo,  
desde siempre y para siempre...*

*Agradezco muy especialmente a mis directores de tesis:*

*Dra. Raquel Cariño Cortés*

*Dr. Gabriel Betanzos Cabrera*

*Dr. José de Jesús Manríquez Torres*

*por haber sido la guía durante la realización de este trabajo, por sus invaluable enseñanzas y consejos.*

*A los Doctores integrantes también del comité por sus valiosas aportaciones:*

*Dr. Tomás Eduardo Fernández Martínez*

*Dr. Manuel Sánchez Gutiérrez*

*A Mi hermano Miguel, antiguos amigos, amigos actuales que tuve la fortuna de conocer a lo largo de este proceso y que sin duda han contribuido de diferentes maneras a su culminación.*

*A Israel, por todo....*

*Por estar presentes, muchas gracias!*

## ÍNDICE

<b>FIGURAS Y TABLAS.....</b>	<b>II</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>IV</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Características y propiedades generales de la granada.....</b>	<b>2</b>
1.1.1 Composición química de la granada.....	4
1.1.1.1 Compuestos fenólicos .....	4
1.1.1.2 Taninos.....	6
1.1.2 Biodisponibilidad y metabolismo de los constituyentes de la granada.....	6
<b>1.2 Antecedentes experimentales de la granada.....</b>	<b>9</b>
1.2.1 Actividad antioxidante.....	10
1.2.2 Efecto antiinflamatorio.....	11
1.2.3 Evidencia anticarcinogénica.....	13
1.2.4 Antecedentes mutagénicos y antimutagénicos.....	14
<b>1.3 Mutación y cáncer.....</b>	<b>16</b>
<b>1.4 Estrés oxidativo.....</b>	<b>19</b>
1.4.1 Estrés oxidativo agudo.....	20
1.4.2 Estrés oxidativo crónico.....	21
1.4.3 Daño a lípidos membranales.....	23
1.4.4 Daño a proteínas y carbohidratos.....	24
1.4.5 Daño al ADN.....	25
<b>1.5 Doxorubicina.....</b>	<b>26</b>
1.5.1 Inhibición de la topoisomerasa II.....	27
1.5.2 Formación de aductos de ADN.....	28
1.5.3 Estrés oxidativo.....	28
1.5.4 Sobreproducción de ceramida.....	30
1.5.5 Propiedades farmacocinéticas de doxorubicina.....	31
<b>1.6 Monitoreo del daño citogenético <i>in vivo</i>.....</b>	<b>32</b>

1.6.1 Ensayo de micronúcleos.....	32
1.6.2 Identificación microscópica de eritrocitos y micronúcleos.....	34
1.7 <b>Nutracéuticos y quimiopreención</b> .....	35
1.7.1 Tratamiento convencional contra el cáncer.....	35
1.7.2 Tratamiento alternativo mediante el uso de plantas o sus productos.....	36
<b>II. JUSTIFICACIÓN</b> .....	39
<b>III. HIPÓTESIS</b> .....	39
<b>IV. OBJETIVOS</b> .....	40
5.1 Objetivo General.....	41
5.2 Objetivos específicos.....	41
<b>V. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	42
5.1 Tipo de estudio.....	44
5.2 Material vegetal y obtención de extractos de granada.....	44
5.3 Evaluación de la capacidad antioxidante.....	44
5.3.1 Actividad inhibidora del catión radical del ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS <sup>+</sup> ).....	44
5.3.2 Determinación de la actividad antiradical por el método 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH <sup>•</sup> ).....	45
5.4 Determinación de compuestos fenólicos totales (CFT).....	45
5.5 Adquisición de animales y población de estudio.....	45
5.6 Determinación de la DL <sub>50</sub> del extracto granada.....	46
5.7 Evaluación de la genotoxicidad y antigenotoxicidad del extracto de granada.....	46
5.8 Determinación de la actividad antiradical en suero por el método 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH <sup>+</sup> ).....	47
5.9 Proteínas totales en hígado y corazón por el método de Lowry).....	47
5.10 Peroxidación lipídica en hígado y corazón.....	48

5.11 Purificación del principio activo.....	48
5.11.1 Cromatografía en capa fina.....	48
5.11.2 Cromatografía en columna.....	49
5.11.3 Resonancia magnética nuclear.....	49
5.12 Análisis estadístico.....	49
<b>VI. RESULTADOS.....</b>	<b>50</b>
6.1 Obtención de extractos de granada.....	51
6.2 Evaluación de la capacidad antioxidante compuestos fenólicos totales (CFT).....	51
6.3 Determinación de la DL <sub>50</sub> del extracto granada.....	52
6.4 Evaluación de la genotoxicidad y antigenotoxicidad del extracto de granada.....	54
6.4.1 Genotoxicidad y citotoxicidad.....	54
6.4.2 Antigenotoxicidad.....	55
6.5 Determinación de la actividad antiradical en suero por el método 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH <sup>+</sup> ).....	56
6.6 Peroxidación lipídica en hígado y corazón.....	57
6.7 Purificación del principio activo.....	59
<b>VII. DISCUSIÓN.....</b>	<b>61</b>
7.1 Obtención y evaluación antioxidante de extractos de granada.....	62
7.2 Estudio de toxicidad subcrónica.....	63
7.3 Evaluación genotóxica y citotóxica <i>in vivo</i> .....	64
7.4 Evaluación antigenotóxica <i>in vivo</i> .....	66
7.5 Evaluación de la capacidad antioxidante <i>in vivo</i> por DPPH <sup>+</sup> en suero y peroxidación lipídica en homogeneizado de hígado.....	68
7.6 Purificación del principio activo.....	70
<b>VIII. CONCLUSIONES.....</b>	<b>72</b>
<b>IX. SUGERENCIAS.....</b>	<b>72</b>

**X. REFERENCIAS ..... 73**

## FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Partes constituyentes del fruto de granada.....	3
<b>Figura 2.</b> Antocianinas presentes en el jugo de granada.....	7
<b>Figura 3.</b> Principales taninos hidrolizables en cáscara de granada.....	8
<b>Figura 4.</b> Etapas de la carcinogénesis.....	18
<b>Figura 5.</b> Mutaciones en proto-oncogenes y genes supresores en el desarrollo de tumores...	18
<b>Figura 6.</b> Panorama general de la relación entre la producción de especies reactivas, estrés oxidativo, desarrollo de enfermedades y el papel de los antioxidantes y la variación genética. ....	21
<b>Figura 7.</b> Etapas de evolución del estrés oxidante.....	22
<b>Figura 8.</b> Cadena de reacciones en el proceso de lipoperoxidación.....	24
<b>Figura 9.</b> Estructura química de doxorubicina.....	27
<b>Figura 10.</b> Estructura del complejo ADN-doxorubicina.....	29
<b>Figura 11.</b> Formación de semiquinona.....	29
<b>Figura 12.</b> Estructura química de la ceramida.....	30
<b>Figura 13.</b> Origen del Micronúcleo.....	33
<b>Figura 14.</b> Frotis de sangre periférica de ratón CD1+ tratado con doxorubicina.....	34
<b>Figura 15.</b> Diseño metodológico del proyecto.....	43
<b>Figura 16.</b> Procedimiento general de obtención de extractos: EMC, EMP Y EBJ.....	51
<b>Figura 17.</b> Cuantificación de fenoles totales por Folin Ciocalteau, y capacidad antirradical mediante reacción con DPPH• y ABTS• <sup>+</sup> en jugo de arilo con y sin semilla.....	52
<b>Figura 18.</b> Cuantificación de fenoles totales por Folin Ciocalteau, y capacidad antirradical mediante reacción con DPPH• y ABTS• <sup>+</sup> en extractos.....	52
<b>Figura 19.</b> Distribución de la masa corporal de ratones administrados con 10, 100 y 1000 mg/kg de EMC. ....	53
<b>Figura 20.</b> Distribución de la masa corporal de ratones administrados con 10, 100 y 1000 mg/kg de EMC. ....	53
<b>Figura 21.</b> Inducción de ENCMN en ratón por extracto metanólico de cáscara y	

daunorubicina (Dau). .....	54
<b>Figura 22.</b> Efecto del EMC sobre la relación EPC/ENC en sangre periférica de ratón	55
<b>Figura 23.</b> Efecto inhibitorio del EMC sobre la frecuencia de ENCMN producidos por Dox.....	56
<b>Figura 24.</b> Efecto inhibitorio del EMC sobre el radical DPPH <sup>+</sup> .....	57
<b>Figura 25.</b> Cantidad de malondialdehído en a) corazón y b) hígado de ratones tratados con Dox y EMC con un tiempo de muestreo de 48h. ....	58
<b>Figura 26.</b> Cantidad de malondialdehído en a) corazón y b) hígado de ratones tratados con Dox y EMC con un tiempo de muestreo de 144h. ....	58
<b>Figura 27.</b> Cromatografía en columna del EMC. ....	59
<b>Figura 28.</b> Espectro de <sup>1</sup> H-RMN de la elusión número 10 del EMC. ....	60

## TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Producción nacional de granada en el 2012, 2013 y 2014.....	2
<b>Tabla 2.</b> Producción estatal de granada en el 2012, 2013 y 2014. ....	3
<b>Tabla 3.</b> Constituyentes fitoquímicos de diferentes partes de granada.....	5
<b>Tabla 4.</b> Distribución de los grupos de animales utilizados en el ensayo.....	47
<b>Tabla 5.</b> Porcentaje de rendimiento de cáscara, arilo y pericaripio de granada.....	51

## RESUMEN

La granada es un fruto cuya producción a nivel nacional destaca en los estados de Guanajuato, Oaxaca e Hidalgo, en este último los municipios de Tasquillo y Chilcuautla son los principales productores. El fruto contiene componentes bioactivos antioxidantes principalmente elagitaninos y proantocianidinas. Diversos estudios experimentales recientes han evidenciado su posible utilidad como alternativa en el tratamiento de desordenes metabólicos como la hipertensión, hiperglucemia y obesidad. Además se avalan sus propiedades antiinflamatorias y anticancerígenas las cuales están asociadas con la producción de radicales libres, por lo que en este estudio se pretende evaluar el efecto de la granada sobre el daño producido por doxorrubicina (Dox) un potente agente genotóxico con la capacidad de generar radicales libres que ocasionan daño al material genético provocando incluso mutaciones. Se obtuvieron extractos metanólicos de cáscara, y pericarpio y butanólico de arilo de granada para determinar su capacidad antioxidante mediante ensayo de ABTS<sup>•+</sup> y DPPH<sup>•</sup>, además del contenido de polifenoles por el método de Folin-Ciocalteu. Se eligió al extracto metanólico de cáscara (EMC) para las evaluaciones genotóxica y antígenotóxica *in vivo* mediante el ensayo de micronúcleos (MN). Para evidenciar el mecanismo de acción se evaluó la actividad antioxidante mediante el ensayo DPPH<sup>•</sup> en suero y la peroxidación lipídica en homogeneizado de hígado y corazón por medio de la determinación de malondialdehído (MDA). Los datos se analizaron por ANOVA de dos vías para establecer diferencias entre los lotes y tiempos, se consideraron estadísticamente significativos con un  $p < 0.05$ . El EMC presentó una concentración de polifenoles y actividad antioxidante *in vitro* mayor que los otros extractos, no mostró toxicidad letal hasta con 5 g/kg en ratón macho CD1+, tampoco genotoxicidad ni citotoxicidad en eritrocitos de sangre periférica durante 15 días de tratamiento. Se encontró que 70 y 700 mg/kg del EMC administrados por vía intragástrica (i.g.) durante 15 días protegieron 40-56% contra el daño clastogénico producido por la administración sistémica única vía intraperitoneal de 10 mg/kg de Dox, además 7, 70 y 700 mg/kg de EMC mantienen los niveles antioxidantes en el tiempo en que se corroboró el mayor daño genotóxico de Dox.

**Palabras clave:** granada, antioxidante, daunorubicina, mutaciones, genotóxico

## ABSTRACT

The national production of Pomegranate fruit highlights in Guanajuato, Oaxaca and Hidalgo states. In Hidalgo state, Chilcuautila and Tasquillo town are the main producers. Among the phytochemicals, anthocyanin and ellagitannins are the major antioxidant compounds found in pomegranate. In several recent experimental studies it has been shown its potential usefulness as an alternative in the metabolic disorders treatment such as hypertension, hyperglycemia and obesity. In addition there are evidence of its anti-inflammatory and anti-cancer properties which are associated with the free radicals production, so the aim of this study was to evaluate the effect of pomegranate fruit against the damage caused by doxorubicin (Dox) a potent genotoxic agent wich has the free radicals generation property that cause genetic material damage even causing mutations. Peel and pericarp methanol and butanolic extract of granada arils were obtained to determine their antioxidant capacity (ABTS<sup>•+</sup> and DPPH<sup>•</sup>) and polyphenol content by Folin-Ciocalteu method. The methanol extract peel (EMC) was selected to genotoxic and antigenotoxic assessments by *in vivo* micronucleus (MN) assay. To study the mechanism of action, it was employ DPPH<sup>•</sup> test in serum to evaluate the antioxidant activity and lipid peroxidation, in mouse liver and heart homogenates by determining malondialdehyde (MDA). One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test was used to compare differences between treatments. Differences were considered as statistically significant when  $P < 0.05$ . EMC showed also strong antioxidant activity, with no apparent toxicity ( $LD_{50} > 5g$  per os) in CD1 mice. Moreover, EMC wasn't genotoxic and cytotoxic in mouse peripheral blood erythrocytes, during 15 days of treatment with the extract. 70 and 700 mg/kg of EMC via intragastric (i.g) protected (40-56%) against clastogenic damage produced by systemic administration of 10 mg/kg of Dox, in addition 7, 70 and 700 mg/kg doses of EMC maintains antioxidant levels in time of higher damage of Dox.

**Keywords:** Pomegranate, antioxidant, daunorubicin, mutations, genotoxic

*Evaluación quimiopreventiva de la granada (*Punica granatum L*) contra el daño producido por la doxorubicina*

## INTRODUCCIÓN



## I. INTRODUCCIÓN

### 1.1 CARACTERÍSTICAS Y PROPIEDADES GENERALES DE LA GRANADA.

La granada (*Punica granatum* L.) un arbusto frutal de hoja caduca, es un miembro de dos únicas especies de la familia Punicaceae (*Punica granatum* y *Punica protopunica*) (1). *P. granatum* es nativa de los Himalayas en el norte de India, pero ha sido naturalizada y cultivada a través del este medio, la región mediterránea de Europa, las partes desérticas del sureste de Asia, África del norte y tropical, y parte de Estados Unidos, específicamente California y Arizona (2). Aunque México no figura como uno de los principales países productores del fruto, de acuerdo a datos de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), el estado de Hidalgo se ha ubicado dentro de los tres primeros lugares a nivel nacional en producción en los años 2012, 2013 y 2014 (Tabla 1) destacando los municipios de Tasquillo, Chilcuautla y Metztitlán (Tabla 2) (3).

**Tabla 1. Producción nacional de granada en el 2012, 2013 y 2014**

Ubicación	Producción (Ton) 2012	Producción (Ton) 2013	Producción (Ton) 2014
Baja california	36.00	36.50	33.60
Coahuila	70.00	100.00	102.50
Colima	114.00	60.00	70.00
<b>Guanajuato</b>	<b>1076.50</b>	<b>933.00</b>	<b>902.25</b>
<b>Hidalgo</b>	<b>911.80</b>	<b>963.10</b>	<b>936.70</b>
Jalisco	55.00	58.00	171.02
Michoacán	40.00	32.40	34.80
Morelos	90.00	100.00	196.00
México	37.50	254.50	218.00
<b>Oaxaca</b>	<b>1224.04</b>	<b>1471.57</b>	<b>1393.76</b>
Puebla	134.80	143.25	96.44
Querétaro	11.00	10.25	10.00
San Luis Potosí	46.35	55.80	49.50
Sonora	586.92	145.00	95.00
Zacatecas	10.50	11.94	21.90

Tomada y modificada de SAGARPA (3).



Tabla 2. . Producción estatal de granada en el 2012, 2013 y 2014

Ubicación	Producción (Ton) 2012	Producción (Ton) 2013	Producción (Ton) 2014
<b>Chilcuautla</b>	<b>200.00</b>	<b>260.00</b>	<b>180.00</b>
<b>Metztitlán</b>	<b>60.00</b>	<b>61.50</b>	<b>63.00</b>
San Agustín Mezquititlán	66.60	60.40	60.00
<b>Tasquillo</b>	<b>529.20</b>	<b>504.00</b>	<b>552.00</b>
Tecoautla	36.00	54.00	53.70
<b>Zimapán</b>	<b>20.00</b>	<b>23.20</b>	<b>28.00</b>

Tomada y modificada de SAGARPA (3).

El fruto es una baya grande que puede ser dividida en arilos, pericarpio y cáscara. El pericarpio corresponde a las membranas delgadas que se sitúan en el interior del fruto y permiten la suspensión de numerosos arilos, cada uno envuelto en sacos que contienen las semillas y el jugo los cuales representan aproximadamente 3 y 30% del peso de la fruta respectivamente y finalmente la cáscara o corteza que incluye la mencionada red interna de membranas (**Figura 1**) (1).

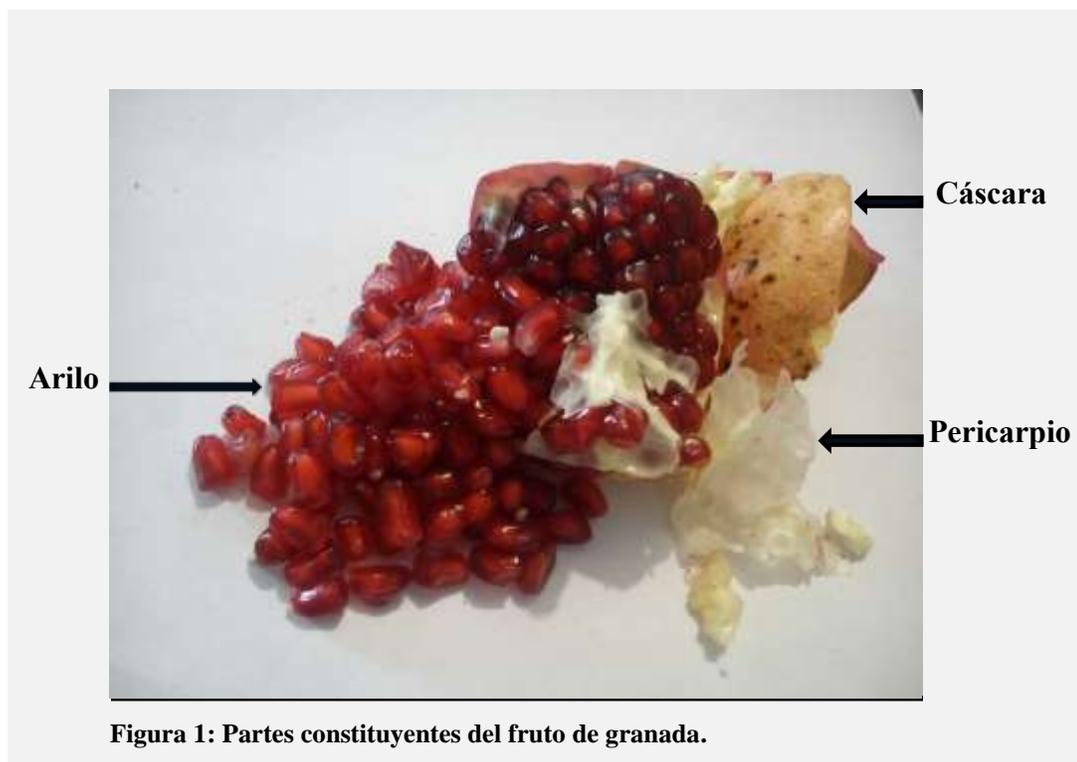


Figura 1: Partes constituyentes del fruto de granada.



### 1.1.1 Composición química de la granada

Hoy en día es ampliamente aceptado que los efectos benéficos a la salud de frutas y vegetales en la prevención de enfermedades se deben a los compuestos bioactivos o “fitoquímicos” que contienen (4). La presencia de cantidades significativas de estos componentes como los compuestos fenólicos, flavonoides y taninos en granada son parte de su valor nutricional (5).

La parte comestible de la fruta (50%) consiste de 40% de arilos y 10% de semillas. Los arilos contienen 85% de agua, 10% de azúcares totales, principalmente fructosa y glucosa y 1.5% de pectina, ácidos orgánicos como el ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido málico, compuestos fenólicos y flavonoides, principalmente antocianinas (5,6). Sin embargo, varios factores pueden contribuir a cambios químicos, incluyendo el cultivo, las condiciones ambientales, madurez, almacenamiento y tratamientos post-cosecha, los cuales pueden afectar su calidad y propiedades biológicas (7).

Cerca del 50% del total del peso de la fruta corresponde a la cáscara, la cual es una importante fuente de compuestos bioactivos como compuestos fenólicos, flavonoides, elagitaninos y proantocianidinas, minerales como potasio, nitrógeno, calcio, fósforo, magnesio y sodio además de polisacáridos complejos (8-10). Las semillas son fuente abundante de lípidos totales; el aceite de semillas de granada comprende del 12 al 20% del peso total de la semilla. El aceite se caracteriza por un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados como el linoléico, linolénico y otros lípidos como el ácido punícico, oleico, esteárico y palmítico (11, 12), esteroides, esteroides y cerebrosidos en muy pequeñas cantidades, además la lignina y sus derivados también han sido reportados con remarcable actividad antioxidante (13). Las semillas también contienen proteínas, fibra cruda, vitaminas, minerales, pectina, azúcares, polifenoles, isoflavones (principalmente genisteína) (Tabla 3) (14, 15).

#### 1.1.1.1 Compuestos fenólicos

Uno de los principales compuestos responsables de la mayoría de las propiedades funcionales de muchos alimentos, entre los que se encuentra la granada, son los compuestos fenólicos (16).



**Tabla 3. Constituyentes fitoquímicos de diferentes partes de granada**

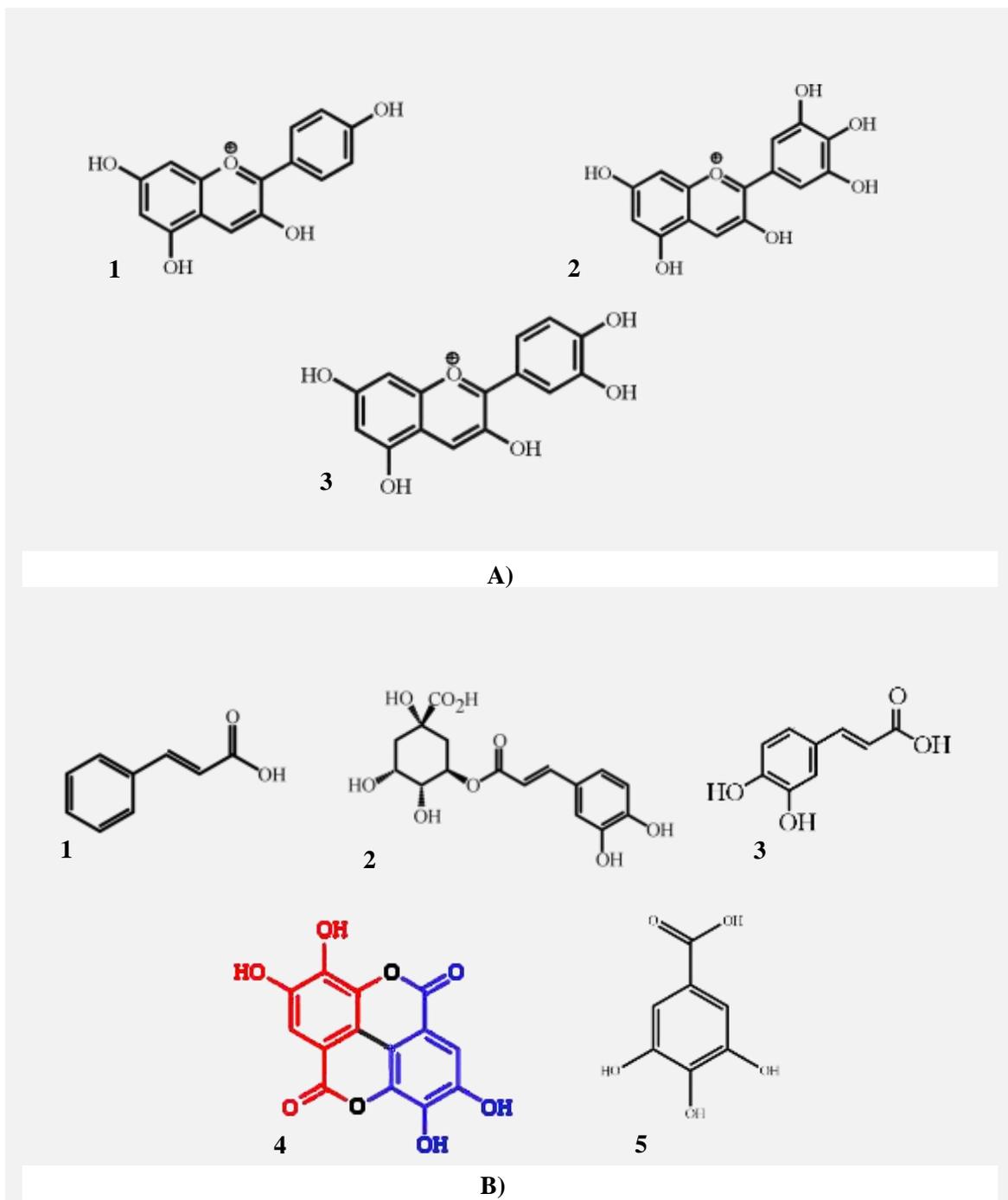
Constituyente de granada	Componentes
Jugo	Antocianinas, glucosa, ácido ascórbico, compuestos fenólicos como ácido elálgico, ácido gálico, ácido cafeico, catequinas, galato de epigallocatequina, quercetina, elementos minerales y aminoácidos.
Pericarpio (cáscara)	Ácido púnico, ácido elálgico (AE), ácidos grasos, esteroides.
Hojas	Componentes fenólicos como punicalaginas (PG), ácido gálico (AG), catequinas, quercetina, rutina, antocianidinas y otros flavonoides.
Flor	Ácido gálico, triterpenoides como ácido ursólico, maslínico y asiático.
Raíces y corteza	Elagitaninos, alcaloides de piperidina.
Semillas	Ácidos grasos poliinsaturados como el linoléico, linolénico y otros lípidos como el ácido púnico, oleico, esteárico y palmítico.

Tomada y modificada de Jurenka (13).

Los polifenoles naturales pueden ser desde simples moléculas (ácidos fenólicos, fenilpropanoides, flavonoides) a compuestos altamente polimerizados (ligninas, melaninas, taninos) (17). Químicamente, los compuestos fenólicos se pueden definir como sustancias que poseen un anillo aromático ligado a uno o más sustituyentes hidrogenados, incluyendo sus derivados funcionales (18). Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que constan de 15 átomos de carbono ordenados en una configuración C6-C3-C6. Esencialmente, la estructura consiste de 2 anillos aromáticos unidos por un puente tricarbonado usualmente en la forma de anillo heterocíclico (19). Las antocianinas son el grupo más grande e importante de flavonoides presentes en los arilos de granada (cianidina, pelargonidina y delfinidina) (Figura 2A). El pigmento le da a la fruta y al jugo su color rojo característico (20). La principal diferencia entre ellos es el número de grupos hidroxilados, el número de azúcares unidos a su estructura, el carboxilato alifático o aromático unido al azúcar en la molécula y la posición de esas uniones (21). Los ácidos fenólicos presentes en el jugo pueden dividirse en dos grupos: aquellos cuya estructura consta de 7 átomos de carbono ordenados en una configuración C6-C1 (ácidos



hidroxibenzoicos) como el (AG) y (AE); y aquellos que constan de 9 átomos de carbono ordenados en una configuración C6-C3 (ácidos hidroxicinámicos) como son el ácido cafeico, ácido clorogénico y ácido p-coumárico (**Figura 2B**) (22, 23).



**Figura 2. Antocianinas presentes en el jugo de granada. A) 1) cianidina 2) delfinidina 3) pelargonidina B) Compuestos fenólicos presentes en el jugo de granada: 1) ácido p-coumárico, 2) ácido clorogénico, 3) ácido cafeico, 4) ácido elágico y 5) ácido gálico.**

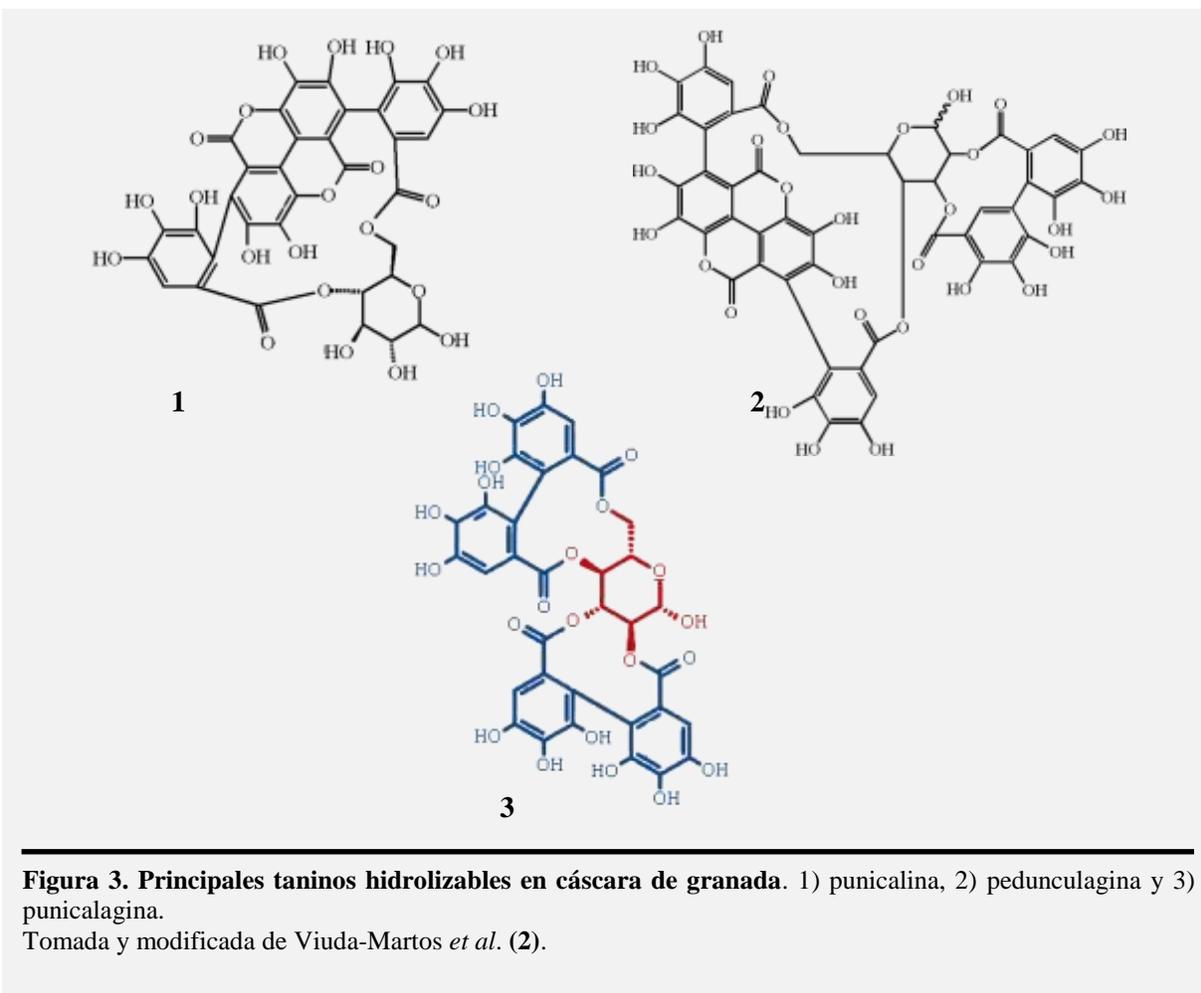
Tomada y modificada de Viuda-Martos *et al.* (2).



### 1.1.1.2 Taninos

Los taninos son polifenoles de alto peso molecular divididos química y biológicamente en tres grupos: taninos condensados o proantocianinas, taninos hidrolizables y galotaninos (24). Los taninos hidrolizables son ésteres de ácido hexahidroxidifénico y un polioli, usualmente glucosa o ácido quínico, son especialmente abundantes en la cáscara de la granada, destacando la punicalina, la pedunculagina y las punicalaginas (**Figura 3**); además contiene ácido hidroxibenzoico como el ácido gálico, ácido esteárico y glicósidos de ácido esteárico (2).

Independientemente de su composición no todos los componentes derivados de la granada presentan efectos benéficos cuando son ingeridos, porque algunos de ellos pueden no ser metabolizados y absorbidos. Por lo tanto hay una necesidad de estudiar el metabolismo y la biodisponibilidad de los metabolitos de la granada (9).



**Figura 3. Principales taninos hidrolizables en cáscara de granada.** 1) punicalina, 2) pedunculagina y 3) punicalagina.

Tomada y modificada de Viuda-Martos *et al.* (2).



### **1.1.2 Biodisponibilidad y metabolismo de los constituyentes de la granada**

La alta capacidad antioxidante de la granada ha sido principalmente atribuida a sus altos niveles de compuestos fenólicos, especialmente a los elagitaninos. Sin embargo poco es conocido a cerca del metabolismo y biodisponibilidad de los elagitaninos de fuentes alimentarias. Los ensayos realizados en humanos, así como en animales, han estudiado la biodisponibilidad, absorción y metabolismo de la granada. En un estudio se detectaron 31.9 ng/mL de ácido elágico y sus metabolitos en el plasma de un individuo una hora después de la ingestión de 180 mL de jugo de granada. El plasma fue aclarado 4 horas después del consumo, sugiriendo que el ácido elágico de alimentos se absorbe en humanos (25). En un estudio con 18 voluntarios sanos se confirmó la rápida absorción de elagitaninos, el aclaramiento plasmático, así como la excreción de urolitina en la orina, hasta 48 h después de la ingestión del jugo de granada, con lo cual se evidencian los beneficios a largo plazo de la administración con granada (26-28). Además no se encontró diferencia en la biodisponibilidad entre jugo, extracto líquido y extracto liofilizado, cuando los niveles de polifenoles estaban estandarizados como equivalentes de ácido gálico. Seeram *et al.* (29) observaron que en 16 voluntarios sanos que consumieron secuencialmente , 240 ml de jugo de granada, 240 ml de extracto líquido de polifenoles de granada y 1 g de polvo de extracto de granada, con un periodo de una semana sin tratamiento entre ellos, los niveles de urolitina A era similares en los 3 grupos. Cuando ingerían el polvo de granada, el tiempo transcurrido hasta que se alcanzaban los máximos niveles en plasma eran superiores (2,58 horas) que cuando consumían jugo (0,65 horas) o extracto líquido de polifenoles (0.94 horas). El ácido elágico, antocianinas o algunos de sus productos de degradación se encontraron en plasma 13 días después de la administración de 1 L de jugo de granada que contenía 4.37 g/L de punicalaginas y 0.49 g/L de antocianinas, durante 15 días (30). Estos estudios demuestran que los elagitaninos son hidrolizados en el estómago, donde parte del ácido elágico es absorbido hacia la circulación. El resto de ácido elágico es metabolizado a derivados de urolitina por la microflora colónica y el resto de derivados de urolitina polar son entonces absorbidos hacia la circulación y posteriormente metabolizados a glucorónidos (31). El ácido elágico que es absorbido, es metabolizado lo que incrementa la excreción y detoxificación al incrementar su solubilidad en agua. Las urolitinas A, B, C y D pueden detectarse en la orina hasta 3-4 días después de la ingestión del zumo de granada, lo



que puede explicar los efectos benéficos de su administración crónica (26-30). Las urolitinas A y B tienen una actividad fundamentalmente antiinflamatoria mientras que las urolitinas C y D tienen una acción sobre todo antioxidante (28). Por lo tanto, los componentes polifenólicos de la granada pueden ejercer sus efectos en diferentes rutas: podrían ser absorbidos y entrar a la circulación actuando directamente como antioxidantes, o pueden ser digeridos por la microflora resultando en otros componentes biológicamente activos.

## 1.2 ANTECEDENTES EXPERIMENTALES DE LA GRANADA

Los extractos de granada han sido usados en la medicina tradicional para tratar varias condiciones incluyendo infecciones parasitarias y microbianas, diarrea, úlceras, hemorragias y complicaciones respiratorias (32,33). Diversos estudios preclínicos sugieren que la granada tiene efectos antibacterianos (34-37), antidiarreico (38, 39), antifúngico (40-42), antioxidante (43-45), antiinflamatorio (20) y antitumoral (1, 20, 25). Recientemente, se ha sugerido su eficacia como terapia de reemplazo hormonal e higiene oral, así como tratamiento de la inmunosupresión y complicaciones cardiovasculares (46). Asimismo se ha demostrado en diversos estudios que los extractos de diversas partes del fruto inhiben potencialmente la invasión y proliferación de las células cancerígenas, causan trastornos del ciclo celular, inducen apoptosis e inhiben el crecimiento del tumor.

### 1.2.1 Actividad antioxidante

La actividad antioxidante de los componentes de la granada ha sido objeto de muchos estudios (6, 47, 48). que sugieren que dicha actividad puede estar relacionada con los diversos componentes fenólicos presentes, incluyendo los isómeros de punicalagina, derivados de AE, y antocianinas (delfinidina, cianidina y pelargonidina 3-glucósido y 3,5-diglucósido), componentes conocidos por su capacidad de eliminar radicales libres e inhibir la oxidación lipídica *in vitro* (49, 50). Sin embargo Tzulker *et al.* (51) sugieren que la PG de la cáscara es uno de los principales constituyentes fitoquímicos que contribuye a la capacidad antioxidante total del jugo de granada, mientras que las antocianinas juegan solamente un papel menor en esta actividad. En un estudio *in vitro* se demostró que el jugo



de granada y los extractos de la semilla tienen de 2-3 veces la capacidad antioxidante que cualquier vino tinto o té verde (50). Se ha demostrado que los extractos de granada captan los radicales libres disminuyendo el estrés oxidativo de los macrófagos y la peroxidación lipídica en los animales e incrementan la capacidad antioxidante en adultos mayores humanos (52, 53). Estudios en ratas y ratones confirman las propiedades antioxidantes de un extracto obtenido del fruto entero excepto el jugo, mostrando una reducción del 19% en el estrés oxidativo en macrófagos peritoneales en ratones, un decremento del 42% de la peroxidación lipídica celular, y un incremento de 53% en los niveles de glutatión reductasa (EC 1.6.4.2.) (52). En un ensayo *in vitro* en el que se utilizó un extracto de jugo de granada fermentado y un extracto de aceite de semilla prensado en frío se encontró que la capacidad antioxidante de ambos fue superior al vino rojo y similar al extracto de té verde (54). Un estudio realizado en ratas con daño inducido al hígado con tetracloruro de carbono demostró que el pretratamiento con extracto de cáscara de granada mejoró o mantuvo la actividad de captación los radicales libres, la superóxido dismutasa (EC 1.15.1.1) y la peroxidasa (E.C. 1.11.1.7) en el hígado, además de 54% de reducción de los valores de peroxidación lipídica comparados con el grupo control positivo (55). Guo, *et al.* (53) demostraron que el jugo hecho con la pulpa de granada (PPJ) tiene una capacidad antioxidante superior que el jugo de manzana, utilizaron el ensayo FRAP (Poder Antioxidante Reductor del Hierro) encontrando que, después de la administración diaria durante 4 semanas de 250 ml de PPJ a personas mayores, se incrementó la capacidad antioxidante de 1.3 mmol a 1.46 mmol, y disminuyó el contenido de carbonilo (un biomarcador del deterioro de la barrera oxidante/antioxidante en varias enfermedades inflamatorias), mientras que los sujetos que consumieron jugo de manzana no experimentaron cambios significativos en estos biomarcadores; debido a que los valores de vitamina E, ácido ascórbico, y glutatión reductasa (EC 1.6.4.2) no difirieron significativamente entre los grupos, las investigaciones sugieren que los compuestos fenólicos de la granada pueden ser los responsables de los resultados observados.

Los mecanismos de acción aún no están establecidos, aunque es claro que son complejos y varios factores pueden desempeñar un papel en específico (56). Madrigal-Carballo *et al.* (57) sugieren que las moléculas polifenólicas sufren reacciones redox porque los grupos hidroxilo fenólicos fácilmente donan hidrógeno a agentes reductores. Negi y Jayaprakasha



(58) han reportado también un incremento significativo en el poder de reducción de los extractos de cáscara de granada con incrementos en la concentración de 50 a 400 ppm, lo cual indica que la cáscara también podría ser una fuente de compuestos polifenólicos.

### **1.2.2 Efecto antiinflamatorio**

La inflamación es un proceso natural de la respuesta inmune innata, para el mantenimiento normal de la función tisular (59). Responde a estímulos desconocidos y conduce a sanar el tejido en procesos fisiológicos normales. No obstante puede convertirse en una inflamación excesiva y crónica si tal proceso no está regulado. Esta alteración es usual y es la base de una variedad de enfermedades severas en el intestino incluyendo la enfermedad inflamatoria del intestino y cáncer colorectal. Los receptores gamma activados por el factor proliferador de peroxisomas (PPAR $\gamma$ ) son reconocidos como inhibidores centrales de la inflamación intestinal en colitis (60). La activación de estos receptores por el ácido púnic dietético ha mostrado aminorar la inflamación intestinal en dos modelos animales, ratas y ratones, con enfermedad inflamatoria del intestino (61).

La colitis necrotizante (NEC) es una enfermedad devastadora asociada con inflamación intestinal excesiva y severa, y es la mayor causa de morbilidad y mortalidad en infantes prematuros. Aunque su etiología es desconocida, se considera que la combinación de la inmadurez intestinal, la alta inmunorreactividad de la mucosa intestinal y la predisposición genética resultan en el desarrollo de esta enfermedad (62). Un estudio reciente mostró que la suplementación con 1.5% de aceite de semilla de granada en la fórmula láctea reduce la incidencia y severidad de NEC en ratas neonatas de 61% a 26% así como la severidad del daño ileal; se encontró reducción en la expresión de citocinas inflamatorias incluyendo IL-6, IL-8, y TNF $\alpha$ ; debido a que esta suplementación incrementa significativamente los niveles del ácido linoleico conjugado, responsable de los efectos protectores en el íleo de ratas con NEC; además se redujeron los niveles de IL-23 e IL-12, que contribuyen a la inflamación intestinal induciendo a los linfocitos T colaboradores (Th17) y la respuesta Th1. Por lo tanto, el aceite de granada parece proteger contra NEC por regulación de la respuesta inflamatoria en el desarrollo de la mucosa intestinal. En general, los efectos benéficos del aceite de semilla de granada en modelos de NEC son asociados con mejora en



la proliferación del enterocito, protección de la arquitectura intestinal y reducción de la expresión de las citocinas proinflamatorias (63).

En otro estudio se determinó la expresión de la enzima sintasa de óxido nítrico (E.C. 1.14.13.39) endotelial arterial se incrementó significativamente en ratas Zucker hembra obesas suplementadas durante 5 semanas con jugo concentrado de granada y extracto del fruto entero (6.25 ml en 1 L de agua), en comparación con los grupos que consumieron solamente agua. El óxido nítrico juega un papel importante como agente antioxidante y antiinflamatorio en las células endoteliales y así atenúa la progresión de la aterosclerosis (64). El jugo de granada también demostró prevenir la destrucción oxidativa del óxido nítrico y mejoró sus funciones antioxidantes y antiinflamatorias (65).

Por su parte el aceite de la semilla de granada prensado en frío (CPSO) ha mostrado que inhibe las enzimas ciclooxigenasa (E.C. 1.14.99.1) y lipooxigenasa (E.C. 1.13.11.12) *in vitro*. La ciclooxigenasa, una enzima clave en la conversión de ácido araquidónico a prostaglandinas (importante mediador de la inflamación) fue inhibida en un 37% por un extracto CPSO. La lipoxigenasa, que cataliza la conversión de ácido araquidónico a leucotrienos, también clave como mediador de la inflamación se inhibió a 75% por un extracto CPSO. Por comparación un extracto de jugo de granada fermentado resultó en un 23.8% de inhibición de lipooxigenasa *in vitro* (54). Otro estudio *in vitro* que puede tener implicaciones de gran alcance para padecimientos como la osteoartritis demostró que un extracto del fruto entero tiene un significativo y amplio efecto sobre la matriz de metaloproteinasas, un subgrupo de enzimas colagenasas (EC 3.4.24.7) expresadas en altos niveles en las lesiones artríticas e involucradas en la rotación, degradación y catabolismo de la matriz extracelular de las articulaciones (66).

### 1.2.3 Evidencia anticarcinogénica

Muchos de los componentes de frutas y vegetales son conocidos por poseer potencial actividad como agentes quimioprotectores. Entre los mecanismos de acción propuestos para esos componentes, están: 1) inhibición de la fase I enzimática o bloqueo de la formación carcinógena; 2) inducción de la fase enzimática II (detoxificación); 3) eliminación de agentes reactivos de ADN; 4) modulación de hormonas homeostásicas; 5) supresión de la proliferación celular inducida por carcinogénesis; 6) inducción de apoptosis; 7) depresión



de la angiogénesis del tumor e 8) inhibición de la expresión fenotípica de células preneoplásicas y neoplásicas.

Ensayos *in vitro* utilizando 3 líneas celulares de cáncer de próstata (DU-145, LNCaP, y PC-3) demostraron que varios extractos de granada (jugo, aceite de semilla y cáscara) inhiben potencialmente la invasión y proliferación de las células cancerígenas, causan trastornos del ciclo celular, inducen apoptosis e inhiben el crecimiento del tumor. Esos estudios también demostraron que las combinaciones de extractos de granada de diferentes partes de la fruta fueron más efectivas que un extracto solo (67, 68).

Kim *et al.* (69) analizaron *in vitro*, algunos productos de la granada como jugo fermentado, extracto acuoso del pericarpio, y aceite de semilla como posibles quimiopreventivos o terapéuticos en cáncer de pecho. Los autores encontraron que el aceite de semilla a dosis de 100 µg/mL inhibe 90% la proliferación de las células MCF-7, 75% la invasión de las células MCF-7 a través de una membrana de Matrigel a dosis de 10µg/mL, y 54% de apoptosis en receptor de estrógeno negativo en células humanas de cáncer de mama metastásico MDA-MB-435 a dosis de 50 µg/mL. En un cultivo de glándula mamaria murina, el jugo fermentado inhibió en un 47% la formación de la lesión cancerosa por el carcinógeno 7,12-dimetilbenz[a]antraceno.

#### **1.2.4 Antecedentes mutagénicos y antimutagénicos**

Estudios con extractos de varias partes de la granada así como de algunos componentes purificados (taninos, ácido eláxico y punicalagina), han demostrado que el fruto tiene propiedades antígenotóxicas sobre el daño genético, inducido por diferentes xenobióticos, y utilizando diferentes metodologías tales como intercambio de cromátidas hermanas, ensayo Ames, frecuencia de MN, anormalidades en la forma de espermatozoides e inhibición de la proliferación de diversas líneas celulares de cáncer, asimismo se concluye que este efecto es dosis-dependiente.

Negi y Jayaprakasha (58) evaluaron la capacidad antioxidante por la formación de complejo de fosfomolibdeno de extractos de cáscara de granada obtenidos por extractor Soxhlet con acetato de etilo, acetona, metanol y agua. Se determinó además la antimutagenicidad contra azida sódica por medio del ensayo de Ames. Todos los extractos fueron antimutagénicos en *Salmonella typhimurium* cepas TA100 y TA1535. Los



resultados globales mostraron que los extractos de cáscara de granada tienen tanto propiedades antioxidantes como antimutagénicas y podrían ser explotados como bioconservantes alimenticios y nutracéuticos. Otra evidencia relacionada es la de Guo *et al.* (53) quienes evaluaron la actividad antioxidante y la prevención del daño al ADN por parte de extractos de cáscara, jugo y semilla de granada por métodos de quimioluminiscencia. La capacidad de barrido del anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) se determinó mediante el sistema pirogalol-luminol, el radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ) a través del sistema  $CuSO_4$ .Phen-Vc- $H_2O_2$  y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) por medio del sistema luminol- $H_2O_2$ . El extracto de cáscara de granada roja tuvo una mayor capacidad de barrido del anión superóxido con un  $IC_{50}$  ( $4.01 \pm 0.09 \mu g/mL$ ), el extracto de semilla de granada blanca tuvo una mayor capacidad de barrido del radical hidroxilo ( $IC_{50}$  fue  $1.69 \pm 0.03 \mu g/mL$ ), el extracto de cáscara de granada blanca tuvo una mayor capacidad de barrido del peróxido de hidrógeno ( $IC_{50}$  ( $0.032 \pm 0.003 \mu g/mL$ ) y finalmente el extracto de semilla de granada blanca tuvo el efecto preventivo más potente contra el daño al ADN ( $IC_{50}$   $3.67 \pm 0.03 \mu g/mL$ ) determinado por el sistema  $CuSO_4$ .Phen-Vc- $H_2O_2$ . Otro estudio, fue el realizado por Sánchez-Lamar *et al.* (70) en el cual se probó la genotoxicidad de un extracto de fruta entera por ensayos *in vitro* e *in vivo* en ratón Balb C, mediante técnicas como: prueba de reversión y conversión del gen en microorganismos, intercambio de cromátidas hermanas, micronúcleos y anomalías en la forma de espermatozoides; el extracto hidroalcohólico del fruto entero resultó genotóxico; en contraste con estos resultados, Valadares *et al.* (71) reportaron la ausencia de efectos mutagénicos de un extracto etanólico de hoja y fruto de granada al encontrar que la frecuencia de MN fue similar en los grupos administrados con el extracto y el control negativo, se utilizaron dosis de 12.5, 25, 50 y 75 mg/kg/día previo a la administración de ciclofosfamida (CF) 24 h antes del término del tratamiento, el ensayo antigenotóxico demostró efecto protector dosis-dependiente contra daño al ADN inducido por CF. Seeram *et al.* (72) evaluaron el efecto antioxidante, antiproliferativo y antiapoptótico *in vitro* de jugo fresco, PG y AE aislados de cáscara, además de un extracto estandarizado de taninos del fruto entero de granada (TPT). La evaluación antioxidante se llevó a cabo por medio de peroxidación lipídica y la capacidad antioxidante equivalente a Trolox utilizando una dosis de 10 mg/mL, para los efectos antiproliferativos se utilizaron dosis de 12.5-100  $\mu g/mL$  que se probaron contra las líneas celulares de tumor oral humano



(KB, CAL27), de colon (HT-29, HCT116, SW480, SW620) y de próstata (RWPE-1, 22Rv1) y para los efectos apoptóticos la dosis empleada fue de 100 µg/mL probadas en líneas celulares HT-29 y HCT116 de colon. El jugo mostró la mayor actividad antiproliferativa contra todas las líneas celulares mediante la inhibición de la proliferación de 30-100%. A 100 µg/mL, el jugo, AE, punicalagina y TPT inducen apoptosis en células HT-29 de colon. La bioactividad superior del jugo mostró los efectos sinérgicos de la acción de múltiples compuestos en comparación con los principios activos purificados individuales. Además de pruebas con extractos de granada existe evidencia del efecto de componentes purificados del fruto, por ejemplo Zahin *et al* (73). demostraron en un primer estudio utilizando los ensayos DPPH\*, FRAP y capacidad antioxidante reductor de ion cúprico (CUPRAC) que la fracción metanólica de cáscara de granada mostró la actividad antioxidante más alta, seguida por las fracciones en etanol, acetona y acetato de etilo; además, encontraron también que la fracción metanólica no mostró signos de mutagenicidad pero si de actividad antimutagénica contra azida sódica (NaN<sub>3</sub>), y metil metanosulfonato (MMS), de 66.76% a 91.86% y contra 2-aminofluoreno (2AF) y benzo[a]pireno (BP) de 81.2 a 88.58% por medio del ensayo de Ames en *Salmonella typhimurium* (TA97, TA98, TA100 y TA102). Esta evidencia fue utilizada por los mismos autores para un segundo estudio en el cual aislaron PG y AE de la fracción metanólica y probaron su actividad antimutagénica contra daño producido por los mutágenos utilizados en el estudio previo mediante ensayo de Ames, aductos de ADN además de viabilidad y proliferación celular; ambos metabolitos presentaron efecto antiproliferativo profundo en células de cáncer de pulmón, inhibieron los aductos de ADN inducidos por BP y antagonizaron de manera marcada y dosis-dependiente el efecto de los mutágenos con inhibición máxima de mutagenicidad superior al 90% (74).

### 1.3 MUTACIÓN Y CÁNCER

Una mutación es un cambio brusco permanente en la secuencia nucleotídica de un gen, que puede dar como resultado una proteína mutada o afectar el control de la síntesis del producto del gen. Si la mutación afecta el ADN de las células reproductoras, se expresa como variación heredable y está sujeta a la selección natural. Estas mutaciones constituyen la materia prima para los cambios evolutivos, pero también pueden ser responsables de



cáncer (75). Mena *et al.* concluyen que el cáncer tiene una relación con las alteraciones del material genético (76).

El cáncer es una enfermedad agresiva, que si no se detecta en una etapa temprana puede conducir a metástasis a otros órganos del cuerpo, lo que podría hacer que la quimioterapia sistémica sea incluso ineficaz. El proceso de desarrollo del cáncer denominado carcinogénesis es un proceso de múltiples fases, fuertemente influenciado por una serie de variables como la edad, hábitos alimentarios y el equilibrio hormonal. Estas fases son conocidas como iniciación, promoción y progresión (77) (Figura 4).

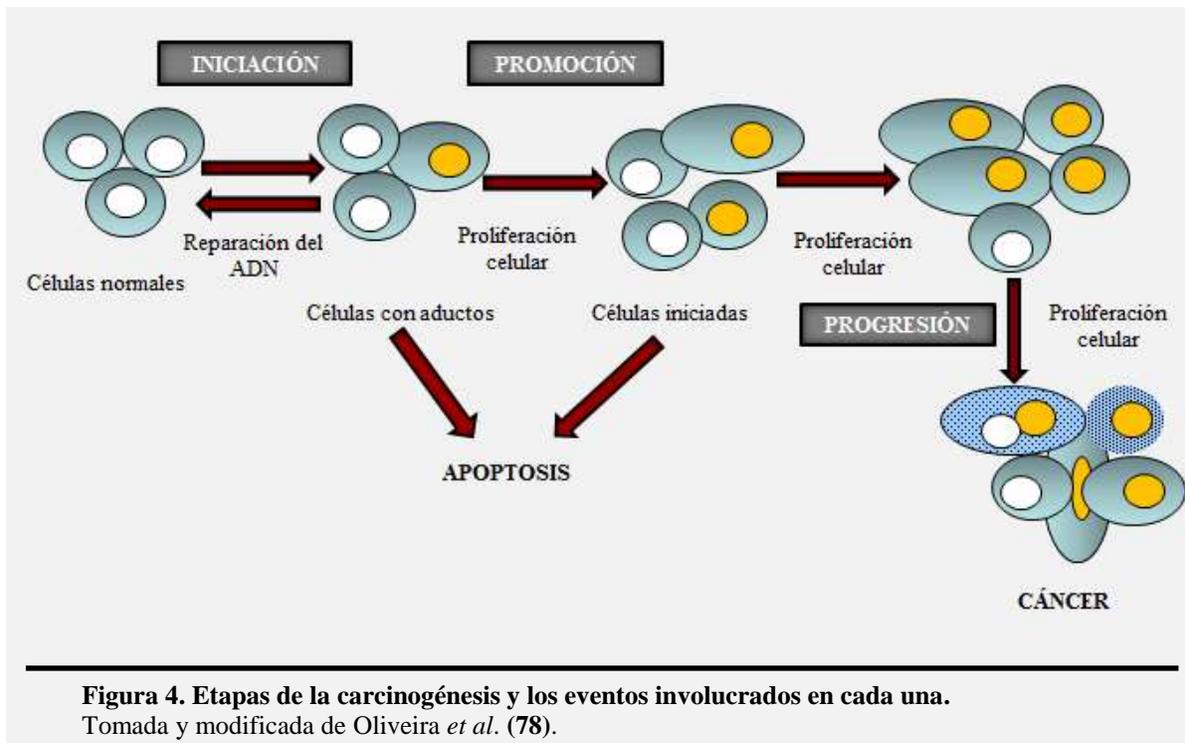
**1.- Iniciación:** Esta fase fue denominada con este nombre desde 1947, es un proceso rápido e irreversible en el que la exposición a un carcinógeno conduce a daño genotóxico. La célula iniciada no es una célula neoplásica, pero ha tomado su primer paso hacia este estado, después se producen sucesivas modificaciones genotípicas y fenotípicas. Desde una perspectiva fenotípica, la célula iniciada es similar a las células restantes. La proliferación celular es esencial para esta etapa, si la división celular se produce antes de que los sistemas de reparación del ADN puedan actuar entonces la lesión se vuelve permanente e irreversible (77, 78).

**2.- Promoción:** es un proceso relativamente largo y reversible en el que las células se someten a proliferación activa que resulta en la acumulación de células preneoplásicas. Los compuestos promotores no interactúan directamente con el ADN y desencadenan efectos biológicos sin ser activados metabólicamente. Estos agentes aumentan la proliferación celular en tejidos susceptibles, contribuyen a la fijación de mutaciones, aumentan las alteraciones en la expresión genética y causan cambios en el control del crecimiento celular. Una vez que desaparece un promotor puede ocurrir una regresión en la proliferación celular, probablemente por apoptosis. No todas las células expuestas a promotores participan en la fase de promoción, sólo las células que son estimuladas a dividirse, que son no diferenciadas, y aquellas que han sobrevivido a la apoptosis, puede contribuir a la inestabilidad entre el crecimiento y la muerte celular y conducir a la aparición de una neoplasia maligna (77, 78).

**3.- Progresión:** es la etapa final y más extensa de la enfermedad, caracteriza por la irreversibilidad, la inestabilidad genética, el crecimiento más rápido, invasión, metástasis y



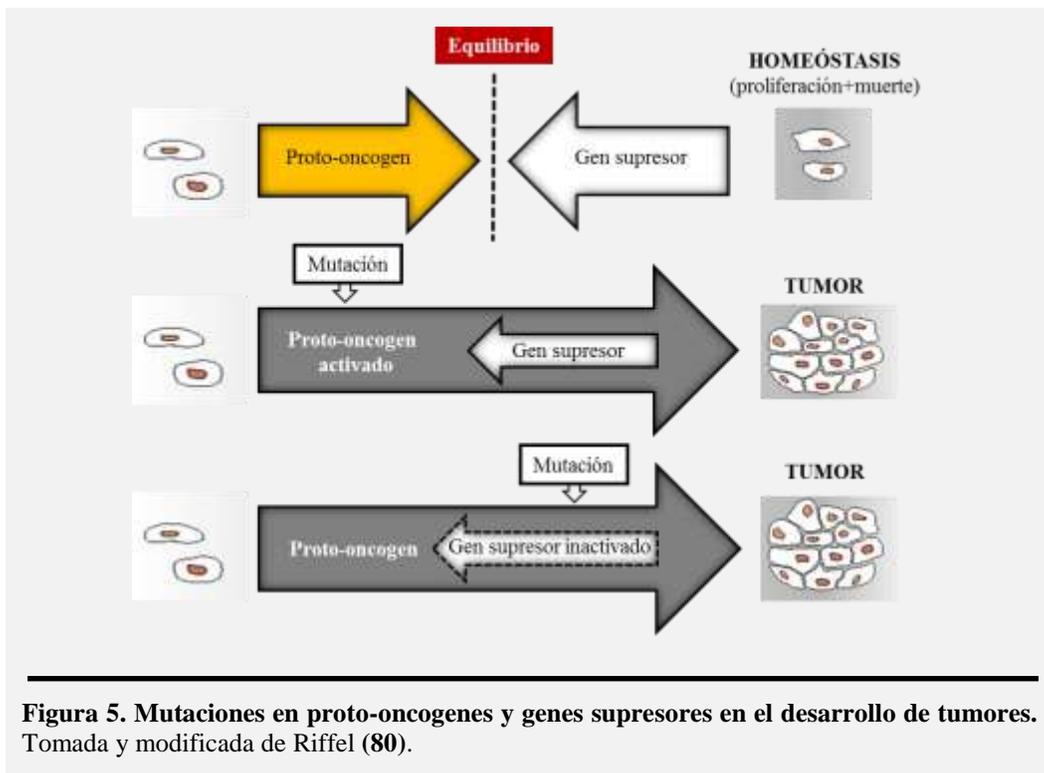
cambios en las características bioquímicas, metabólicas y morfológicas de las células (77, 78).



**Figura 4. Etapas de la carcinogénesis y los eventos involucrados en cada una.**  
Tomada y modificada de Oliveira *et al.* (78).

El cáncer constituye uno de los problemas biomédicos más frecuentes y graves. Las estadísticas muestran que alguna forma de esta enfermedad afecta a más de una tercera parte de la población, provocando más del 20% de todas las muertes. En países desarrollados genera más del 10% del costo total de la atención médica. El cáncer no es una sola enfermedad sino un nombre aplicado a una gran variedad de tumores que se forman por el mismo proceso básico de crecimiento descontrolado. Aunque es conveniente particularizar que la etiología de cáncer es multifactorial, una de las principales causas es la mutación génica y cromosómica. Las mutaciones que provocan cáncer afectan a los genes responsables de la proliferación celular, del desarrollo celular y las que controlan otras actividades celulares fundamentales. Las mutaciones se presentan en dos tipos de genes, los proto-oncogenes, que al mutar y activarse originan la oncogénesis y con ello propician la transformación maligna y los genes supresores que bloquean el desarrollo del tumor regulando los genes que participan en el crecimiento celular (79) (Figura 5).





**Figura 5. Mutaciones en proto-oncogenes y genes supresores en el desarrollo de tumores.** Tomada y modificada de Riffel (80).

Otra causa importante de daños al ADN, implicados en la carcinogénesis puede ser la sobreproducción de radicales libres, lo que origina estrés oxidativo que puede dañar células y tejidos.

## 1.4 ESTRÉS OXIDATIVO

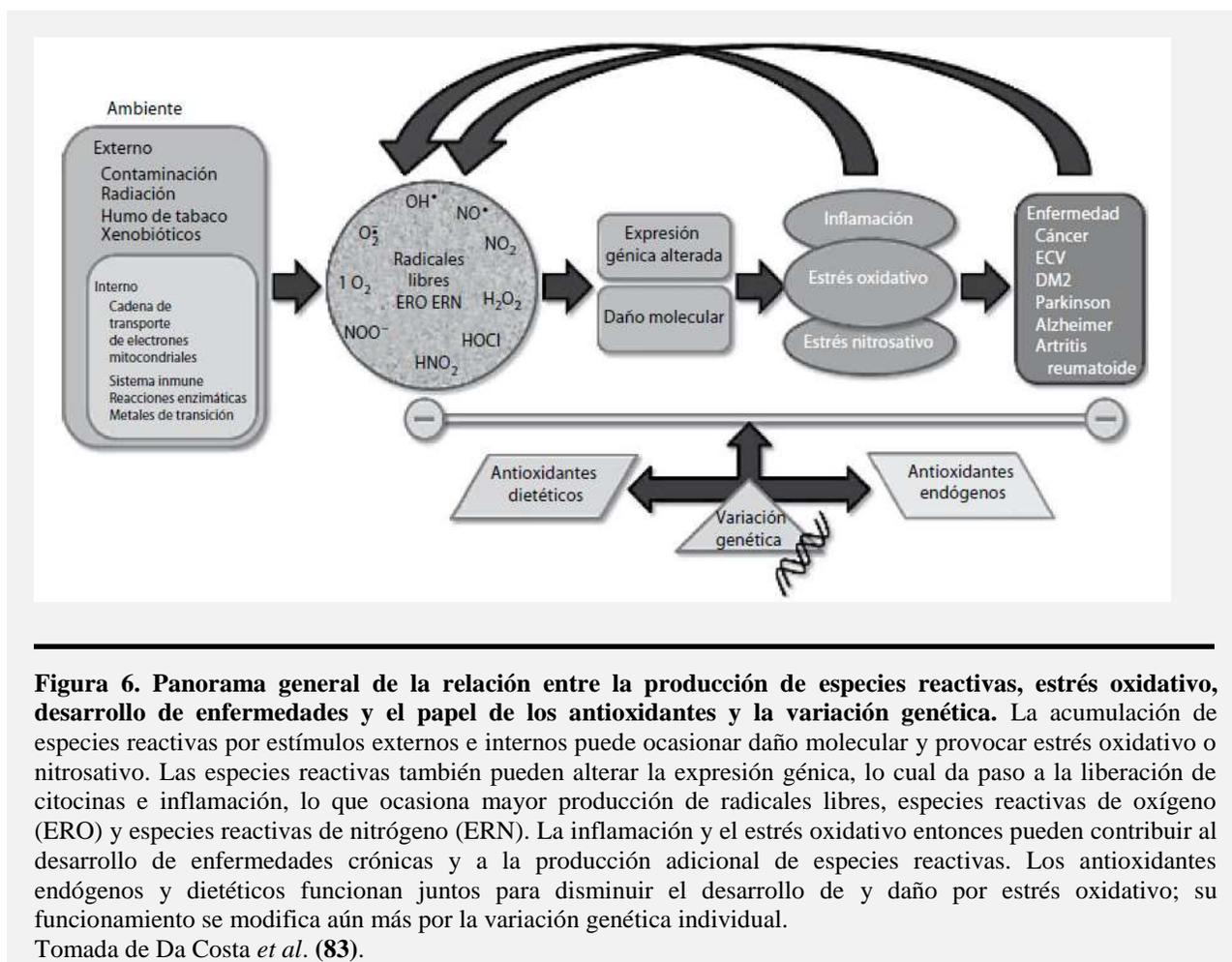
El estrés oxidativo es un desequilibrio entre la producción y acumulación de especies reactivas que pueden generar radicales libres y la capacidad del organismo para manejarlas mediante antioxidantes endógenos y exógenos. Los radicales libres son especies químicas que tienen un electrón no apareado, que las habilita como fragmentos moleculares muy reactivos (81). Un antioxidante se define como aquella sustancia que presente en concentraciones muy pequeñas comparadas con las de un sustrato oxidable, disminuye o evita la oxidación de éste. En bioquímica puede considerarse como un donador de electrones capaz de evitar una reacción en cadena de óxido-reducción (82). Los antioxidantes exógenos obtenidos de la dieta, incluidos vitamina C, vitamina E y



carotenoides, tienen funciones importantes en la prevención y disminución del estrés oxidativo (83). Los antioxidantes endógenos incluyen las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD; EC 1.15.1.1) catalasa (CAT; EC 1.11.1.6), glutatión peroxidasa (GPx; EC 1.11.1.9) y glutatión *S*-transferasa (GSTs; EC 2.5.1.13). El estrés oxidativo puede contribuir al desarrollo de enfermedades crónicas, incluidas osteoporosis, diabetes tipo 2, enfermedades neurodegenerativas, padecimientos cardiovasculares y cáncer (83). La producción controlada de radicales libres permite la realización de varios procesos fisiológicos, incluyendo la señalización celular, la transcripción de genes y la respuesta inmune (84). En el proceso del metabolismo aerobio, la fuga de electrones a lo largo de la cadena de transporte de electrones en la mitocondria da paso a la producción del anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ). Otras reacciones biológicas, incluidas las irrupciones oxidativas producidas por los fagocitos y los sistemas enzimáticos como el citocromo P450 y la xantina oxidasa, también contribuyen a la producción de estas especies altamente reactivas (85). Sin embargo, la producción o acumulación excesiva de especies reactivas puede tener efectos deletéreos al participar en reacción de óxido-reducción (redox) y ocasionar daño a macromoléculas, membranas celulares y ADN (84, 86). Esto puede alterar las propiedades biológicas de las membranas, enzimas y receptores, afectar el funcionamiento celular y provocar la muerte celular (87). Por esta razón, se ha desarrollado una red compleja de sistemas de defensa en humanos para protegerle contra la producción excesiva de y el daño por las especies reactivas en un esfuerzo por mantener la “homeostasis redox” (84). Cuando la producción o acumulación de radicales libres o especies reactivas de oxígeno y nitrógeno supera la capacidad del organismo para defenderlo, se produce un estado de estrés oxidativo (o estrés nitrosativo) (84, 87). Además del daño directo de moléculas biológicas y tejidos, el estrés oxidativo también puede activar factores de transcripción como el factor nuclear NF- $\kappa$ B, que desencadena cascadas de señalización que provocan la liberación de citocinas e inflamación (88). El estrés oxidativo ha sido objeto de investigación intensa en años recientes y se ha vinculado con la patogenia de varias enfermedades crónicas, incluidos cáncer, osteoporosis, diabetes tipo 2, padecimientos neurodegenerativos y enfermedad cardiovascular. Esto se ha fundamentado por diversos estudios que demuestran que las dietas con gran contenido de frutas y vegetales, y por ello, ricas en antioxidantes dietéticos, se relacionan con un riesgo reducido de enfermedad crónica. La capacidad para



manejar y prevenir el estrés oxidativo depende del funcionamiento de los sistemas de defensa antioxidantes endógenos y exógenos, los cuales pueden estar influidos por la variación genética individual. Los polimorfismos de nucleótido único en genes que codifican para enzimas antioxidantes endógenas o proteínas implicadas en la captación y utilización de antioxidantes dietéticos pueden tener un impacto directo sobre la capacidad para manejar el estrés oxidativo y prevenir el desarrollo subsecuente de enfermedades en un individuo. Inclusive, los sistemas antioxidantes endógenos y exógenos interactúan, y las complejas interacciones entre genes y dieta pueden influir aún más sobre la capacidad de un individuo para manejar el estrés oxidativo (**Figura 6**) (87).



**Figura 6. Panorama general de la relación entre la producción de especies reactivas, estrés oxidativo, desarrollo de enfermedades y el papel de los antioxidantes y la variación genética.** La acumulación de especies reactivas por estímulos externos e internos puede ocasionar daño molecular y provocar estrés oxidativo o nitrosativo. Las especies reactivas también pueden alterar la expresión génica, lo cual da paso a la liberación de citocinas e inflamación, lo que ocasiona mayor producción de radicales libres, especies reactivas de oxígeno (ERO) y especies reactivas de nitrógeno (ERN). La inflamación y el estrés oxidativo entonces pueden contribuir al desarrollo de enfermedades crónicas y a la producción adicional de especies reactivas. Los antioxidantes endógenos y dietéticos funcionan juntos para disminuir el desarrollo de y daño por estrés oxidativo; su funcionamiento se modifica aún más por la variación genética individual.

Tomada de Da Costa *et al.* (83).



### 1.4.1 Estrés oxidativo agudo

Dado que el estrés oxidante es en ocasiones menos intenso, debido a un desequilibrio menor, su expresión en cambios estructurales y funcionales, suele ser más sutil que el proceso crónico, ya que generalmente es mediado por las ERO menos reactivas como son el  $O_2^{\cdot-}$  y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ); moléculas que a concentraciones y actividades controladas tienen una importante participación fisiológica, pero que al generarse en una proporción mayor a la funcional afectan las características de procesos intracelulares vitales de regulación y suelen acompañar también a procesos crónicos (82).

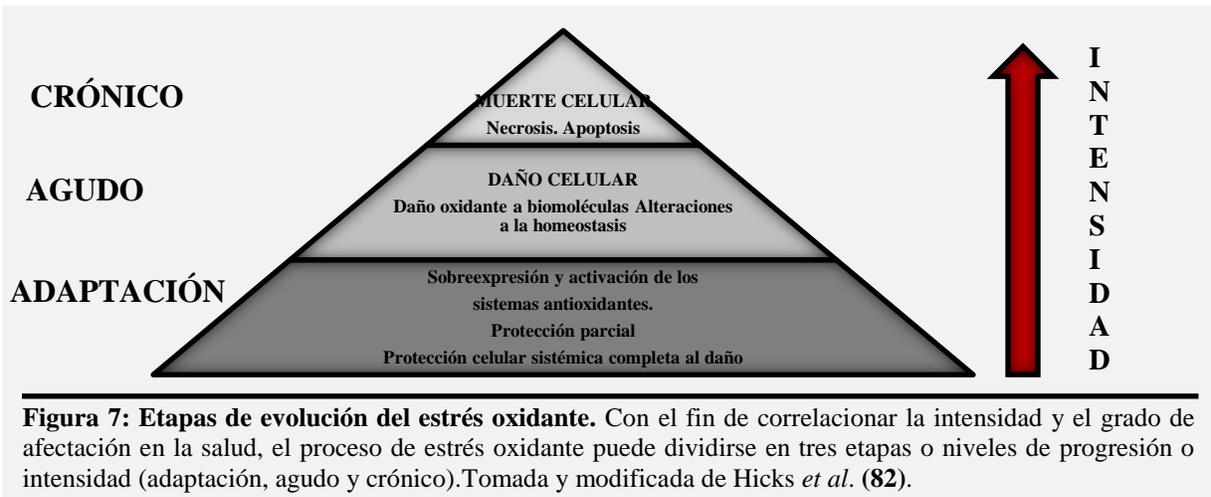
### 1.4.2 Estrés oxidativo crónico

Generalmente se trata de un proceso que al ser mediado fundamentalmente por el radical hidroxilo ( $OH\cdot$ ), se manifiesta por rompimiento o modificación de biomoléculas (hidroxilación) con la consecuente liberación de una segunda generación de productos de oxidación que a su vez son moléculas muy reactivas, amplificando y propagando el daño que se manifiesta como daño celular y tisular. El daño molecular puede ser cuantificado en fluidos biológicos, destacando el plasma sanguíneo, dado que permite evaluar el rompimiento o modificación de moléculas y organelos celulares cuyos productos se incorporan a la circulación para que en el mejor de los casos sean sometidos a procesos de desintoxicación en el hígado y eliminación renal. En contraste, las moléculas generadas por el daño oxidante pueden interactuar con otras biomoléculas, afectándolas en su estructura y función. Algunas modificaciones inducidas por este tipo de estrés oxidante se reflejan como cambios bioquímicos intracelulares (estrés oxidante intracelular) y se manifiestan fundamentalmente por alteraciones funcionales locales y sistémicas (hipertensión arterial, arritmias, fibrilación, bronco-constricción, shock). Tanto en el estrés agudo como en el crónico, se presentan dos mecanismos de daño, el oxidativo y el no oxidativo (modificación de la homeostasis), la diferencia es que en el agudo, la eliminación del reto oxidante permite la recuperación celular y del organismo; en contraste, en el crónico el daño es frecuentemente irreversible (82).

Con el fin de considerar la intensidad y el grado de afectación en la salud, el proceso de estrés oxidante puede dividirse en tres etapas o niveles de progresión o intensidad (adaptación, agudo y crónico), tomando en consideración las características del daño



estructural y funcional ejercido como consecuencia de la reactividad de las diferentes especies reactivas (reto oxidante), así como el tiempo de exposición a las mismas y la evidencia concomitante de modificaciones en los procesos biológicos afectados (**Figura 7**).

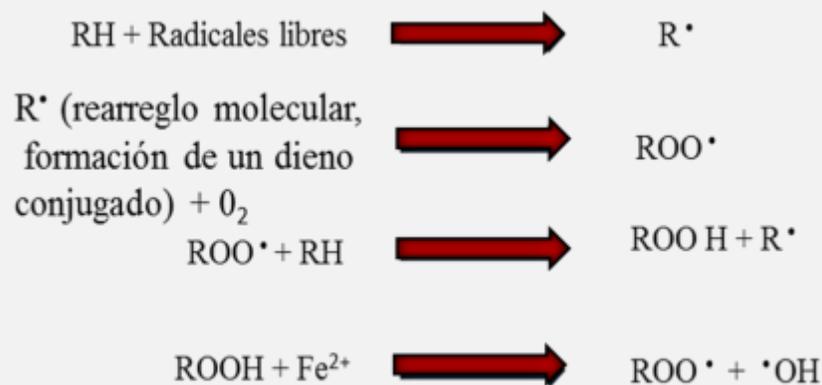


### 1.4.3 Daño a lípidos membranales

La oxidación de los lípidos membranales provoca alteraciones en la permeabilidad, o la pérdida de la integridad de la membrana plasmática de los organelos celulares. Con respecto a la permeabilidad se afecta tanto el transporte pasivo como el activo al alterarse las interrelaciones de fluidez de los lípidos que forman las membranas biológicas. Los ácidos grasos poli-insaturados, que predominantemente se ubican en las membranas celulares, son particularmente susceptibles al ataque de los radicales libres. Cuando los  $\text{OH}\cdot$  se forman cerca de la membrana son capaces de extraer átomos de hidrógeno de los fosfolípidos que la componen, después de esta reacción aunque el  $\text{OH}\cdot$  original se ha inactivado, se forma un radical lipídico, el que después de un rearrreglo molecular (dieno conjugado), puede reaccionar con el oxígeno para originar el radical peroxilo ( $\text{R}\cdot\text{OO}\cdot$ ), este puede reaccionar con otros ácidos grasos de la membrana, formando más radicales lipídicos, mientras él mismo se transforma en hidroperóxido ( $\text{R}\cdot\text{OOH}$ ), el que en presencia de varios complejos metálicos puede descomponerse en más radicales, incluyendo entre ellos al  $\text{OH}\cdot$ , lo que provoca un fenómeno de expansión del daño, en el que se considera que la peroxidación se ha propagado (**Figura 8**). En ausencia de iones metálicos los R-



OOH pueden acumularse en la membrana y con esto alterar su función, pueden transformarse en aldehídos, dentro de los que el más estudiado es el MDA que puede provocar daño al ADN. Alternativamente el R-OO• puede dar origen a peróxidos cíclicos, los que pueden descomponerse para formar radicales lipídicos. A este fenómeno globalmente se le denomina lipoperoxidación y en ausencia de algún proceso que lo inhiba puede provocar la rápida destrucción de la fase lipídica de las membranas. Durante el proceso de lipoperoxidación se forman otros compuestos que afectan otras estructuras celulares, tales como hidroxialquenes, siendo el 4-OH-2,3-transnonenal uno de los más tóxicos. Los alquenes son compuestos que reaccionan con el ADN, inhiben la síntesis de proteínas y ARN, así como la reparación del ADN y se unen al glutatión disminuyendo la capacidad protectora dentro de la célula. Dentro del proceso de lipoperoxidación, los radicales formados pueden causar también daños a las proteínas membranales, inactivando receptores o enzimas unidas a las membranas. La lipoperoxidación no sólo daña a las membranas, ya que también tiene efectos sobre lipoproteínas plasmáticas. Un incremento en la lipoperoxidación ha sido también asociado con el envejecimiento (89).



**Figura 8. Cadena de reacciones en el proceso de lipoperoxidación.**  
Tomada de Gonzalez-Torres *et al.* (89).

#### 1.4.4 Daño a proteínas y carbohidratos

En proteínas y carbohidratos, los radicales libres pueden inducir fragmentación con la pérdida de la función de estas moléculas. Los aminoácidos aromáticos, la cisteína, los enlaces disulfuro y los enlaces peptídicos son fragmentados por los radicales libres



alterándose su estructura y su función. El OH<sup>·</sup> es muy reactivo con las proteínas y puede causar modificaciones en casi todos los residuos de aminoácidos, pero en particular ataca a la tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina, metionina y cisteína, forma entrecruzamientos de tipo covalente e induce la fragmentación de la cadena polipeptídica, lo que se traduce en una pérdida de la función, o en mayor susceptibilidad a las enzimas proteolíticas. Datos experimentales muestran que el radical peroxinitrito (ONOO<sup>·</sup>) oxida a las proteínas membranales y citoplásmicas, afectando su naturaleza física y química. Diversas reacciones de oxidación pueden convertir algunos residuos de aminoácidos, como la prolina, la arginina y la lisina, a derivados de tipo carbonilo. La presencia de este grupo químico se ha utilizado como un parámetro para evaluar el daño oxidativo en las proteínas. De esta manera, se ha estimado que 2 nmol de grupos carbonilo por miligramo de proteína, cantidad observada en personas jóvenes, representan un daño del 10% del total de las proteínas celulares, mientras que en los ancianos este porcentaje se incrementa a 20 y 30% del total de las proteínas celulares. Este incremento de proteínas dañadas podría relacionarse con deficiencias en su eliminación, o con un incremento en la tasa de oxidación de proteínas durante el envejecimiento. A nivel de aminoácidos los radicales libres pueden inducir cambios específicos en su estructura, como los atribuidos al OH<sup>·</sup> que convierte la fenilalanina a o-tirosina, y al óxido nítrico que transforma la tirosina en nitrotirosina. Estos dos aminoácidos no están presentes normalmente en las proteínas, por lo que representan marcadores útiles para evaluar daño oxidativo. Las alteraciones conformacionales provocadas en las proteínas por los radicales libres se relacionan con la pérdida de la actividad catalítica de enzimas tales como la lisosima y la ribonucleasa. La inactivación de enzimas por la oxidación inducida por medio de radicales libres y la acumulación intracelular de proteínas oxidadas, podrían jugar un papel crítico en la alteración de las funciones celulares y en la muerte celular. A nivel de la membrana plasmática, las alteraciones inducidas sobre sus proteínas afectan a los transportadores, los canales proteicos, los receptores o proteínas reguladoras y a los inmunorreguladores lo cual puede tener consecuencias letales para las células. Los efectos de los radicales libres sobre los carbohidratos, son poco conocidos, pero se ha establecido que el ácido hialurónico, la condroitina y el dermatán sulfato, todos ellos polisacáridos del grupo de los glucosaminoglucanos, son susceptibles a su degradación en presencia de las especies



reactivas de oxígeno, particularmente a los radicales  $O_2^{\cdot -}$  y  $OH^{\cdot}$ , lo que probablemente altera la función de los proteoglicanos de los que forman parte y esto se ha relacionado con la patogenia del proceso inflamatorio (89).

#### 1.4.5 Daño al ADN

El daño provocado a nivel del ADN por los radicales libres puede generar mutaciones somáticas, que llevarían a la síntesis de proteínas defectuosas, y posiblemente a la generación de transformaciones malignas. Uno de los componentes de la molécula de ADN que es susceptible a ser dañado por radicales libres es la desoxirribosa, que al oxidarse puede inducir el rompimiento del enlace entre este azúcar y el grupo fosfato del siguiente nucleótido, mecanismo mediante el cual se forman rompimientos de cadena sencilla, los que son reparados por medio de las enzimas correspondientes. Cuando gran cantidad de  $OH^{\cdot}$  atacan una parte restringida de la molécula de ADN, se forman numerosos rompimientos de cadena sencilla, que por su cercanía podrían conducir a la formación de rompimientos de cadena doble, los que provocan daño permanente al material genético. La reactividad del  $OH^{\cdot}$  hacia los diferentes átomos de hidrógeno de la desoxirribosa varía considerablemente, siendo los carbonos 4 y 5 los sitios primarios de reacción, ya que en la molécula de ADN son los que quedan más expuestos. Los  $OH^{\cdot}$  tienen la capacidad de reaccionar también con las bases nitrogenadas del ADN. El tipo predominante de alteración que puede observarse a este nivel son las substituciones, aunque también es frecuente observar deleciones y con menor frecuencia inserciones. Se ha visto que las substituciones frecuentemente involucran al par guanina-citocina, con el que los  $OH^{\cdot}$  y el oxígeno simple reaccionan directamente. Las mutaciones se concentran en regiones específicas del ADN, que se denominan “puntos calientes”, lo que indica que están relacionadas con las secuencias de bases púricas y pirimídicas. Es probable que el oxígeno simple reaccione con la guanina eliminándola del ADN, lo que provoca la formación de rompimientos de cadena sencilla, o bien, que pueda generar un gran número de productos de reacción derivados de ella los que constituirán los llamados sitios sensibles al álcali, que se convertirán en rompimientos después de tratamiento alcalino. Uno de los productos formados es la 8-hidroxi-guanosina, la que puede formarse por los radicales libres directamente sobre la molécula de ADN; o sobre los precursores de la misma, esta molécula puede identificarse



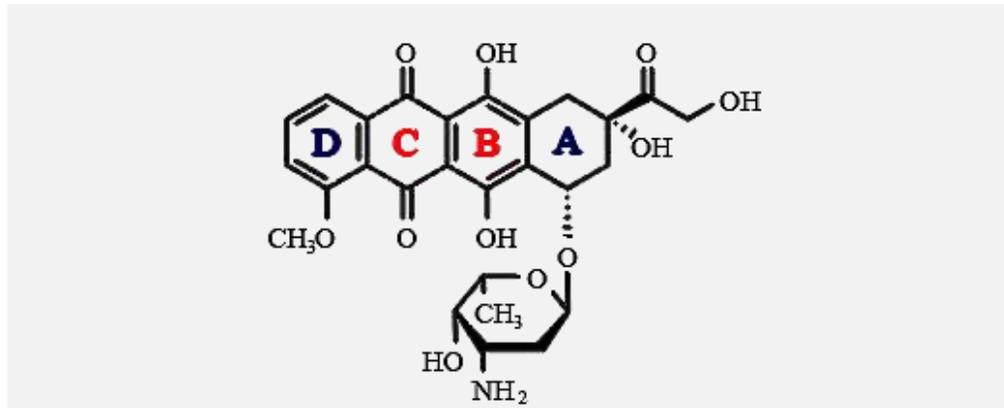
en la orina humana, cuando el daño al ADN fue reparado. Las mutaciones se establecen cuando una cadena de ADN dañada es copiada durante la duplicación. Otra posibilidad, es que la duplicación quede bloqueada cuando la ADN polimerasa (EC 2.7.7.7) encuentra una lesión, o bien, en estos puntos de lesión la enzima puede leer erróneamente el mensaje de la cadena dañada y generar una cadena complementaria defectuosa (89).

En la naturaleza existen ciertos compuestos producidos por el hombre, conocidos como xenobióticos, capaces de producir algún efecto sobre los seres vivos debido a que la toxicidad de muchos de ellos está mediada por la formación de radicales libres de oxígeno.

## 1.5 DOXORRUBICINA

La Dox (14-hidroxi-daunorrubicina o adriamicina) pertenece a una clase de compuestos con estructuras similares, denominados antraciclinas. Tal como daunorrubicina (Dau), el primer compuesto de antraciclina que se describió, Dox fue aislado de *Streptomyces peucetius*, una bacteria del suelo (90, 91). En la **Figura 9** se muestra su estructura química. La Dox es uno de los agentes quimioterapéuticos más utilizados y generalmente es prescrita en combinación con otros fármacos, tiene un amplio espectro de actividad. Es uno de los fármacos más eficaces para el tratamiento de tumores sólidos, por ejemplo, cáncer de mama, cáncer de pulmón y tratamientos de carcinoma de ovario. Se ha comprobado su actividad contra tumores de vejiga, estómago, hígado y tiroides, Ewings y tumores óseos osteogénicos, sarcoma de tejidos blandos, neuroblastoma y tumor de Wilms. De igual forma es activo contra el mieloma múltiple, varios tipos de leucemia y linfoma cutáneo de células T. También juega un papel importante en el tratamiento de la enfermedad de linfoma Hodgking y no-Hodgkin (92). El mecanismo por el cual las antraciclinas inhiben el cáncer aún no está completamente claro y se cree que múltiples vías participan en la citotoxicidad de esta clase de fármacos contra el cáncer.





**Figura 9. Estructura química de doxorubicina:** Está constituida por un anillo tetracíclico plano (anillos A, B, C y D) y por cadenas laterales variables que incluyen un aminoazúcar. Los anillos centrales (B y C) poseen grupos quinona e hidroquinona que actúan como donantes o receptores de electrones y son capaces de formar radicales libres. Tomada y modificada de Malla *et al.* (93).

### 1.5.1 Inhibición de la topoisomerasa II

Las topoisomerasas son enzimas altamente conservadas es decir, su secuencia genética ha prevalecido a través de la evolución, están presentes en prácticamente todas las formas de vida, desde las bacterias hasta los seres humanos, y regulan la topología del ADN para facilitar la replicación, transcripción, y otros procesos nucleares (94). Muchos fármacos antibacterianos y anticancerígenos se dirigen a las topoisomerasas para la eliminación de células, tales como las camptotecinas, etopósido y quinolonas (95). El modelo de acción de efecto más retardado de Dox implica la inhibición de topoisomerasa II (EC 5.99.1.3), lo que resulta en que la doble cadena de ADN se rompe y ocurre muerte celular programada (apoptosis) (96, 97). La enzima topoisomerasa se une a ADN superenrollado y ADN enredado, rompe ambas cadenas de un dúplex de ADN, pasa al otro duplex a través de la brecha resultante y se vuelve a sellar la rotura. Este proceso resulta en la liberación de la tensión torsional formada durante los procesos biológicos tales como la replicación del ADN y la transcripción (95). Además, la topoisomerasa II es esencial para el desanudamiento del ADN durante la mitosis, y la deficiencia en la topoisomerasa II previene la citocinesis normal, lo que resulta en la muerte celular (98). El etopósido, atrapa a la topoisomerasa II en los sitios de rotura, estabiliza el complejo de escisión e impide el resellado del ADN (99). Se ha planteado la hipótesis de que Dox funciona de una manera similar y se ha demostrado que los niveles de la topoisomerasa II determinan la efectividad de su tratamiento en un modelo de ratón de linfoma (100, 101). Sin embargo, hay muchos



ejemplos en los que la doxorubicina mediada por la muerte celular es independiente de la topoisomerasa II, por ejemplo, se demostró que doxorubicina causa la muerte celular independiente de la topoisomerasa II en una línea celular leucémica promielocítica (102). Además, la Dox, así como otro fármaco antracíclico, aclarrubicina, que no atrapa la topoisomerasa II, desaloja histonas independientes de la topoisomerasa II que conduce a la muerte celular (103, 104).

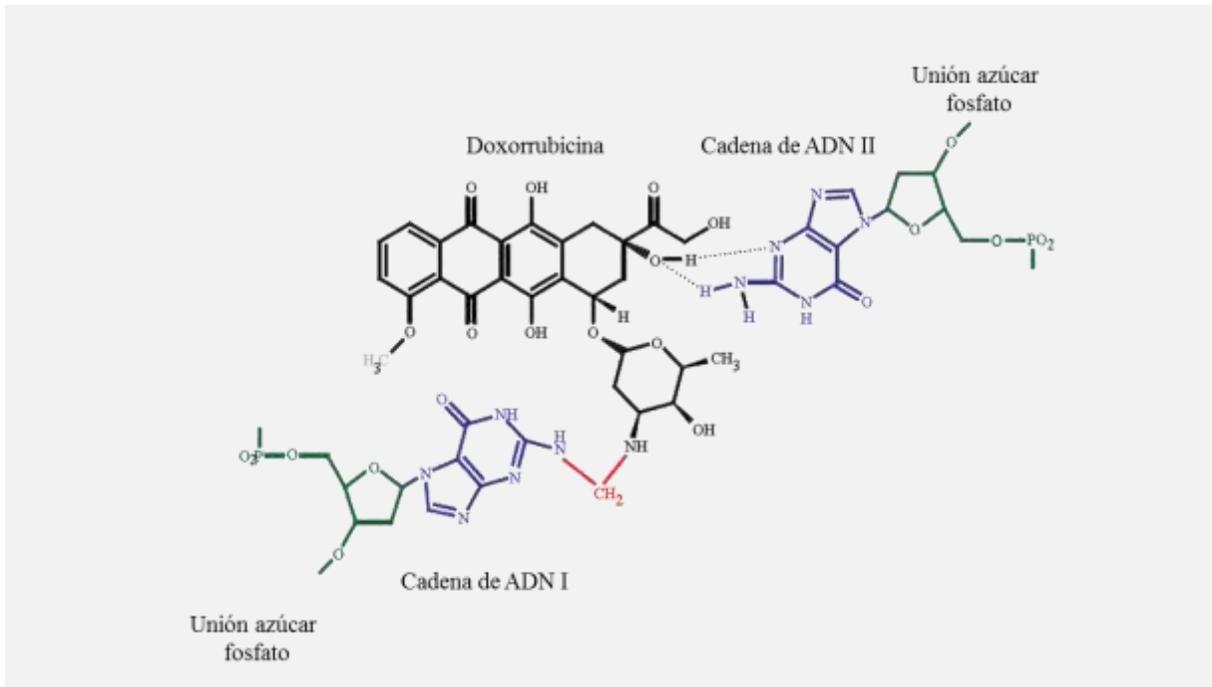
### **1.5.2 Formación de aductos de ADN**

Dox se intercala con el ADN en el sitio que contiene pares de bases GC adyacentes, probablemente debido a la formación específica de enlaces de hidrógeno entre la doxorubicina y la guanina (105, 106). La formación de aductos de ADN de la Dox ha demostrado que activa respuestas de daño al ADN e induce la muerte celular independiente de la topoisomerasa II (102, 107). La interacción entre la Dox y el ADN puede ser estabilizada por un enlace covalente mediado por el formaldehído celular que es generado por reacciones de radicales libres a partir de fuentes de carbono, tales como lípidos y espermina (108, 109). Esta interacción implica la formación de un enlace covalente entre la Dox y la guanina en una cadena de ADN y de un enlace de hidrógeno entre la Dox y la guanina en la cadena opuesta (Figura 10).

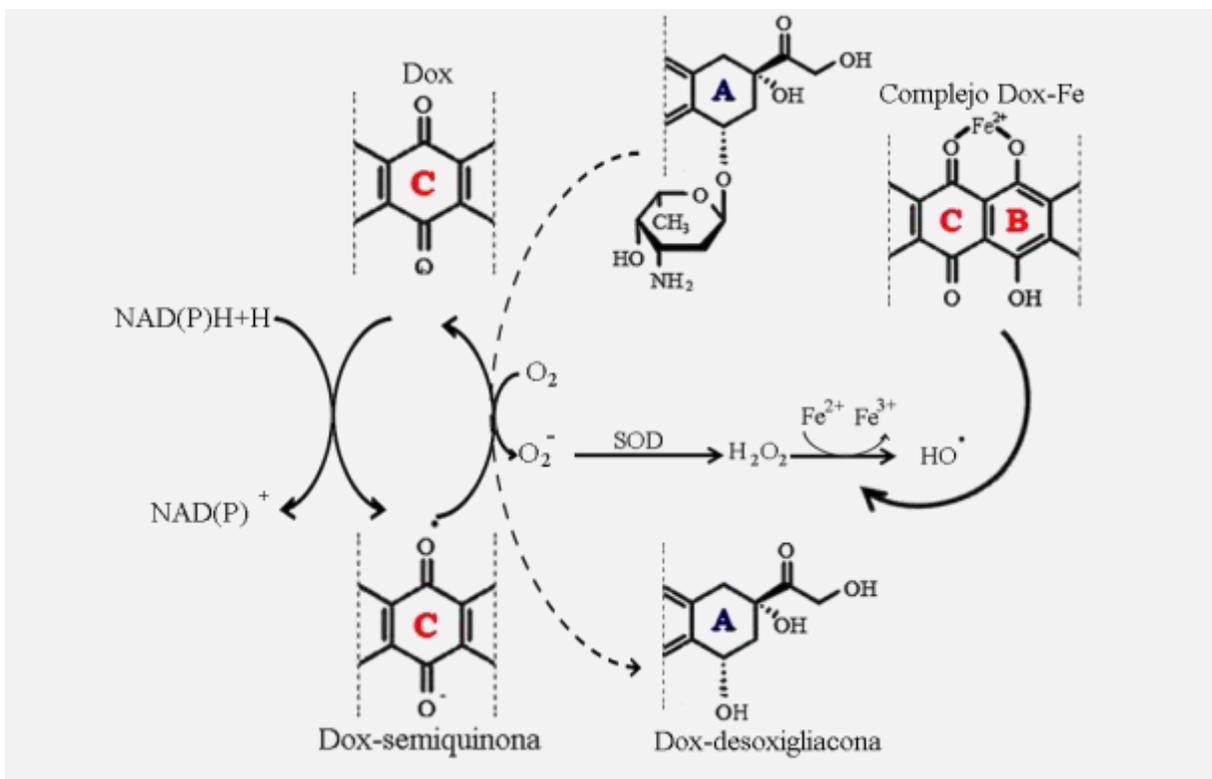
### **1.5.3 Generación de radicales libres**

Una adición de electrones a la fracción de quinona en el anillo C de las antraciclina conduce a la formación de semiquinona que se regenera de nuevo a quinona al reducir el oxígeno a las especies reactivas de oxígeno como el  $O_2^{\cdot -}$  y  $H_2O_2$  (Figura 11). El radical semiquinona puede oxidar dentro de la unión entre el anillo A y daunosamina que se traduce en deglicosilación. La aglicona formada de este modo tiene mayor solubilidad en lípidos y puede intercalarse en las membranas biológicas y formar especies reactivas de oxígeno que pueden afectar objetivos sensibles (110, 111). El ciclo redox de un electrón de la Dox se ha demostrado que induce la liberación del hierro almacenado. La Dox forma complejo con el hierro y este complejo Dox-Fe cataliza la conversión de  $H_2O_2$  al  $OH^{\cdot}$  que es una de las especies reactivas de oxígeno más potentes (112, 113).





**Figura 10. Estructura del complejo ADN-doxorrubicina.** La Dox forma un enlace con guanina en una hebra de ADN mediada por enlaces de hidrógeno y formaldehído con guanina en la cadena opuesta. Tomada y modificada de Yang *et al.* (95).



**Figura 11. Formación de semiquinona.** La fracción de semiquinona en el anillo C se reduce formando semiquinona. Tomada y modificada de Torres y Simic (114).



#### 1.5.4 Sobreproducción de ceramida

Además de la generación de radicales libres y el aumento en el metabolismo oxidativo, el tratamiento con Dox aumenta los niveles de ceramida (115-118). La ceramida es una molécula lipídica compuesta de una esfingosina y un ácido graso que está implicado en una variedad de procesos celulares incluyendo la detención del crecimiento, apoptosis y la senescencia (Figura 12)(119).

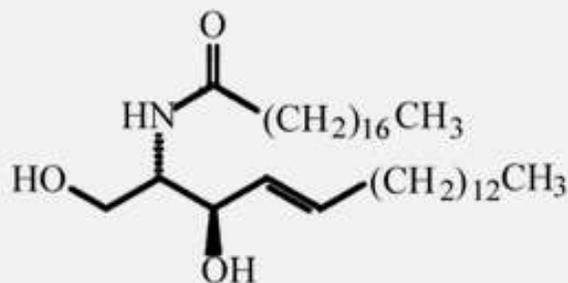


Figura 12: Estructura química de la ceramida

Curiosamente, la ceramida permeable exógena sensibiliza a las células cancerosas a la apoptosis inducida por Dox (120). Además, el tratamiento con Dox aumenta los niveles de ceramida en células MCF-7 sensibles a Dox pero no en las células MCF-7-ADRR resistentes a Dox, lo que sugiere que los niveles de ceramida podría mediar la resistencia a la Dox. De hecho, la regulación a la alta de glucosilceramida sintasa (GCS), una enzima que convierte la ceramida a glucosilceramida, se asocia con la resistencia celular a la Dox, mientras que la supresión de GCS restaura la sensibilidad a la Dox resultando en la muerte celular (121-124). Recientemente, se ha informado que Dox tiene un nuevo papel en el bloqueo de la proliferación de las células cancerosas a través de la estimulación de la síntesis de ceramida y la mejora de la proteólisis de un factor de transcripción sintetizado como precursor de membrana CREB3L1 (elemento sensible a la proteína de unión 3L1) unido a la membrana (125). Curiosamente, el nivel de expresión CREB3L1 está asociada con la sensibilidad celular a la Dox, a pesar de su expresión no se requiere para otros fármacos contra el cáncer tales como etopósido, bleomicina, o paclitaxel para inhibir el



crecimiento celular. Sorprendentemente, no se observó la muerte celular después del tratamiento con Dox en este estudio (125). Estos hallazgos sugieren que la sobreproducción de ceramida podría estar involucrada específicamente en la sensibilización de las células cancerosas al tratamiento con doxorubicina, pero es poco probable que este efecto implique cambios en el panorama de la cromatina (95).

### 1.5.5 Propiedades Farmacocinéticas de doxorubicina.

**Absorción.** La Dox no se absorbe en el tracto gastrointestinal. Dado que el medicamento es extremadamente irritante para los tejidos, su administración es por vía intravascular (intravenosa o intraarterial). Se ha demostrado que la administración intravesical es factible: siguiendo esta vía de administración, el paso de la Dox dentro de la circulación sistémica es mínimo (126).

**Distribución.** La vida media de la distribución inicial es aproximadamente 5 minutos sugiriendo una rápida absorción tisular de doxorubicina, mientras lenta eliminación de los tejidos se refleja por una vida media terminal de 20 a 48 horas. Los rangos del volumen de distribución del estado estable van de 809 a 1214 L/m<sup>2</sup> y es indicativo de una absorción extensa del medicamento en tejidos. La unión de Dox y su metabolito principal doxorubicinol, a las proteínas plasmáticas es cerca de 74 al 76% y es independiente de la concentración plasmática de doxorubicina hasta 1.1 µg/mL (126).

**Metabolismo.** Dox no atraviesa la barrera hematoencefálica, pero sí la placenta, y es metabolizada ampliamente en el hígado por la enzima aldoceto reductasa que origina su metabolito principal, el doxorubicinol. También, aunque en menor medida, Dox es sustrato de la isoforma 3A4 del citocromo P450 y el metabolito que origina es la doxorubicina-7-desoxiaglicona. Doxorubicinol tiene aproximadamente el 10% de la actividad de Dox y junto con el metabolito 7-desoxiaglicona son los principales responsables de su toxicidad (126).

**Excreción.** Se estima que el aclaramiento sistémico de doxorubicina está alrededor de 55 L/h, con una variabilidad interindividual cercana al 20%. El aclaramiento hepatobiliar, alrededor de 25 L/h, supone aproximadamente el 50% del aclaramiento de Dox y coincide con la fracción de dosis eliminada por bilis en los 7 días sucesivos al tratamiento. Por el contrario, su aclaramiento renal es bajo, alrededor de 7 L/h, y tan solo un 12% de la dosis



se recupera en orina después de 6 días desde el inicio del tratamiento. El aclaramiento es menor en pacientes de edad avanzada, obesos y mujeres (127).

## 1.6 MONITOREO DEL DAÑO CITOGENÉTICO *in vivo*

Las alteraciones cromosómicas han sido utilizadas como criterio de valoración biológica importante para estudiar los efectos mutagénicos de la radiación ionizante y los productos químicos. Las aberraciones cromosómicas estructurales y numéricas se encuentran a menudo en los recién nacidos humanos (0,6%) y en abortos espontáneos (30 a 40%). Además, muchos tumores se asocian con alteraciones cromosómicas que pueden estar involucrados en las etapas de iniciación o promoción de la carcinogénesis. Estos hechos ponen de relieve la importancia del estudio de las aberraciones cromosómicas *per se* como un punto final biológico relevante para evaluar los riesgos que supone la exposición a agentes cancerígenos mutagénicos. En los estudios *in vivo*, sólo algunos tejidos son susceptibles de análisis cromosómico, siendo el requisito previo que las células sean capaces de proliferar. Este requisito limita el número y tipo de células que pueden ser estudiados, y por lo tanto generalmente se utilizan células de médula ósea, linfocitos de la sangre, células regeneradas del hígado, o células germinales masculinas (128).

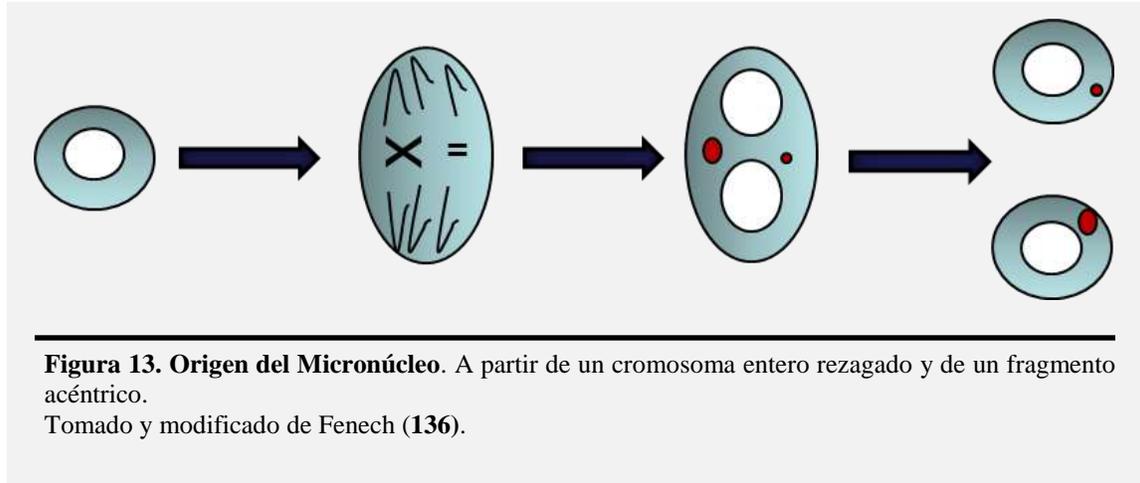
Algunas de estas técnicas para monitorear el daño citogenético son: intercambio de cromátidas hermanas, citogenética espermática, comparación interespecies y la prueba de micronúcleos.

### 1.6.1 Ensayo de micronúcleos

El ensayo de MN fue propuesto por Heddle (129) y Schmid (130), constituye un ensayo alternativo para evaluar el daño cromosómico *in vivo*. Los MN se presentan en células en división que contiene algún cromosoma fragmentado carente de centrómero (fragmento acéntrico) o cromosomas enteros que son incapaces de desplazarse hacia los polos durante la mitosis (131, 132) y son excluidos del núcleo durante la división celular (133, 134). Durante la telofase, se forma una envoltura nuclear alrededor de los cromosomas rezagados o fragmentos cromosómicos, asimismo se desenrollan y gradualmente asumen la morfología de un núcleo en interfase más pequeño que el núcleo principal de la célula, de



aquí el término "micronúcleo" (**Figura 13**). También son conocidos en hematología como cuerpos de Howell-Jolly (**135, 136**).

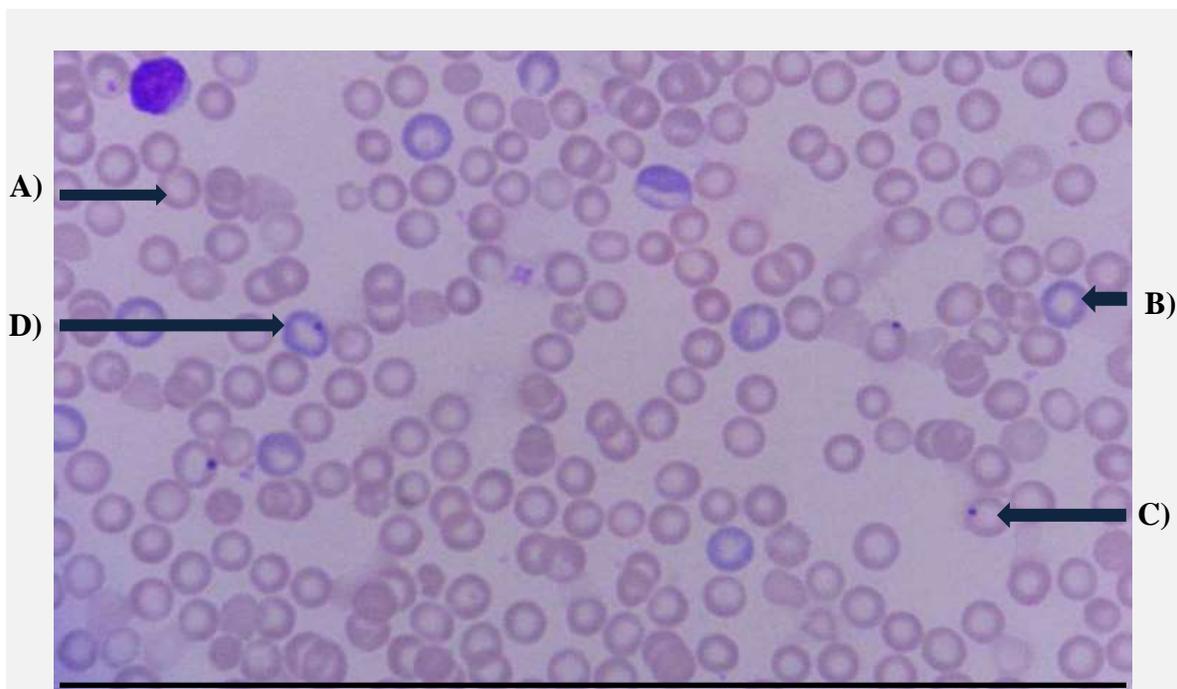


El ensayo *in vivo* de MN se utiliza para detectar potencialmente la acción de agentes químicos, físicos y biológicos, así como determinar su mecanismo de acción. Un agente clastogénico, origina MN compuestos de fragmentos cromosómicos debido a: a) ruptura directa del ADN; b) replicación sobre un template de ADN dañado; o c) inhibición de síntesis de ADN (**136**). Los agentes aneugénicos, originan MN con al menos un cromosoma completo o una cromátida; debido a alteraciones en: a) el huso mitótico, b) el cinetocoro, c) centríolo, d) centrosoma (**137-139**). Los ratones y ratas son las especies más frecuentemente utilizadas en diversos trabajos de investigación, de los cuales se emplean principalmente células de médula ósea y de sangre periférica (**134**). Esta última ha sido utilizada ampliamente en trabajos de toxicología y bioensayos de carcinogénesis de largo tiempo (**132, 140**). El ensayo de MN se ha realizado con diferentes tipos celulares como son: células germinales (**141**), hepatocitos (**142**), células de hígado fetal (**143**), linfocitos (**144, 145**), células de bazo (**146**), células de colon (**131**), además de exfoliados de células que son obtenidos de la mucosa bucal, bronquio, vejiga; uréter y estómago. Actualmente el principal tipo celular utilizado en médula ósea y/o sangre periférica de rata y ratón son los eritrocitos (**147, 148**).



### 1.6.2 Identificación microscópica de eritrocitos y micronúcleos

Los eritrocitos policromáticos (EPC) presentan una coloración que incluye a la basofilia y eosinofilia. Como aún contienen ácido ribonucleico se observan con un tinte azulado-violáceo, su tamaño es un poco mayor al de los eritrocitos normocrómicos (ENC), generalmente un aumento en su número con respecto a los valores normales indica una eritropoyesis aumentada. De tal forma que, además de identificar el potencial genotóxico de cierto xenobiótico, sugiere su citotoxicidad al realizar el conteo de la relación EPC/ENC (149, 150). La **Figura 14** muestra ejemplos de ENC, EPC y la presencia de MN en ambas células (en un frotis de sangre periférica de ratón CD1+).



**Figura 14.** Frotis de sangre periférica de ratón CD1+ tratado con doxorubicina. Se observan en su mayoría A) ENC, las células de color azul B) corresponden a los EPC. En ambos estadios eritrocitarios puede existir la presencia de micronúcleos como se observa en C) ENCMN y D) EPCMN.



## 1.7 NUTRACÉUTICOS Y QUIMIOPREVENCIÓN

El término nutracéutico fue definido inicialmente en 1989 por el Dr. Stephen DeFelice creador de la Fundación para la innovación en medicina como cualquier sustancia que pueda considerarse como alimento o parte de un alimento que proporciona beneficios a la salud, incluyendo la prevención o tratamiento de una enfermedad. Fennema (151) lo define como una sustancia bioactiva presente en los alimentos que presenta propiedades que mejoran la salud, previenen enfermedades y/o tienen propiedades medicinales con un impacto en la salud humana.

Por otra parte la quimiopreención es un área de rápido crecimiento de la oncología preventiva que se centra en la prevención del cáncer mediante la administración de uno o más agentes de origen natural o sintético para suprimir, revertir o prolongar el proceso de la carcinogénesis. Cada vez es más evidente que los compuestos quimiopreventivos presentes en la dieta ofrecen un gran potencial en la lucha contra el cáncer inhibiendo el proceso de la carcinogénesis mediante la regulación de la maquinaria de defensa y muerte celular. Los efectos quimiopreventivos de verduras y frutas pueden atribuirse a un efecto combinado de varios fitoquímicos fenólicos que son generalmente antioxidantes en la naturaleza, junto con las vitaminas, fibras dietéticas, indoles, compuestos allium y selenio, expresa el intento deliberado de frenar o revertir el progreso de las células premalignas hacia la malignidad. Algunas de las sustancias hasta ahora investigadas corresponden a nutrimentos comunes, y otras a compuestos farmacológicos sintéticos. El concepto antimutágeno se usa para describir a aquellos agentes que tienen la capacidad de reducir la frecuencia de mutaciones espontáneas o inducidas, y por consiguiente, disminuir la incidencia de cáncer en el humano (77).

### 1.7.1 Tratamiento convencional contra el cáncer

Actualmente se han desarrollado muchos fármacos con potencial para combatir la proliferación de células cancerosas. Sin embargo, muchos de los medicamentos nuevos obtenidos por síntesis química y/o derivados de plantas no tienen el efecto esperado en la clínica, esto debido a la complejidad de la enfermedad. Los tratamientos actuales para el



cáncer se basan principalmente, en la cirugía, la radiación y la quimioterapia. La selección de uno de ellos o su combinación depende de la etapa en que se encuentre el tumor. En el caso de la quimioterapia, ésta es empleada como tratamiento principal cuando el tumor se encuentra en las etapas II, III y/o IV. Esta estrategia consiste en administrar un fármaco que tenga la capacidad de inhibir el crecimiento tumoral y/o provocar la muerte celular. Actualmente, el principio de acción de la mayoría de estos compuestos se basa en el mayor potencial replicativo de la célula cancerosa en comparación con el de la células sanas, por lo que estos compuestos también ocasionan la muerte de las células no cancerosas que crecen y se dividen rápidamente como lo son las de la sangre. Los principales blancos terapéuticos descritos en la literatura son; a) interacción con el dímero de tubulina, b) inhibidores de la topoisomerasa, c) inhibidores de histonas, d) inhibidores de proteínas cinasas (EC 2.7), e) inhibidores de chalconas; f) interacción con el DNA, g) activación de caspasas (3.4.22), etc. El daño a las células sanas causa efectos secundarios que pueden ser muy graves, incluso algunas veces más severos que la misma enfermedad. Una parte de la investigación en el desarrollo de estos fármacos, en época reciente, se enfoca a encontrar medicamentos que sean específicos para las células tumorales, con lo cual se espera incrementar la eficacia del tratamiento y reducir los efectos secundarios. En este contexto algunos blancos terapéuticos propuestos actualmente son: los inhibidores de la angiogénesis y de la metástasis (152).

### 1.7.2 Tratamiento alternativo

Las plantas han sido y seguirán siendo una posible alternativa para la búsqueda nuevos compuestos bioactivos que sirvan de base en el desarrollo de nuevos fármacos, México posee una fuente de recursos naturales importante es especial las propiedades antioxidantes que presentan algunas de las sustancias que componen los alimentos de la dieta humana generan la posibilidad de su uso y aplicación para contrarrestar los daños ocasionados por agentes mutágenos y cancerígenos (153, 154). Al estrés oxidativo, se le ha relacionado con el daño genotóxico, y en este sentido, se ha observado que algunas plantas o sus componentes que presentan potencial antioxidante, tienen efectos protectores sobre los daños inducidos sobre el material genético (155). De ahí que el estudio de sustancias con propiedades antioxidantes surge como una opción para la prevención y como coadyuvante



en el tratamiento de enfermedades crónico-no transmisibles relacionadas con el estrés oxidativo y con el daño genotóxico. Se estima que las células humanas sufren diariamente alrededor de 10.000 reacciones de los radicales libres y que los antioxidantes (endógenos y exógenos) los pueden contrarrestar. Particularmente, los polifenoles presentan un alto potencial antioxidante relacionado con la disminución de enfermedades crónicas y de algunos tipos de cáncer. Los mecanismos responsables de la inhibición de la formación de tumores por parte de los compuestos de las plantas incluyen: a) los mecanismos de adsorción física (por ejemplo, las fibras contenidas en los vegetales pueden adsorber y retener sustancias cancerígenas impidiendo su absorción).; b) la inducción de la síntesis de ciertas enzimas (citocromo P450, en el intestino y el hígado, que pueden convertir sustancias cancerígenas en productos menos tóxicos); c) el aumento en la actividad de P-glicoproteína (por ejemplo, el flavonoide kaempferol aumenta la expresión de P-glicoproteína que previene que las sustancias cancerígenas penetren a las células y alcancen al ADN); d) la inducción de la apoptosis y la detención del ciclo celular (Figura 14) e) la inhibición de la formación de radicales libres; f) la inhibición de la ciclooxigenasa, la enzima responsable de la producción de prostaglandinas, moléculas endógenas que facilitan los procesos de angiogénesis (el resveratrol, que se encuentra en el vino tinto, es un inhibidor de la COX-2). Los compuestos de plantas con acción quimiopreventiva deben responder a una serie de características muy precisas: ausencia de efectos secundarios y de alta eficacia, tolerancia y finalmente costo reducido (156).



*Evaluación quimiopreventiva de la granada ( *Punica granatum L*) contra el daño producido por la doxorrubicina*

## JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS



## II. JUSTIFICACION

El cultivo de granada, requiere de ciertas condiciones climáticas como luz solar intensa, inviernos suaves y calurosos con temperaturas mínimas no inferiores a los 12 °C, y veranos secos sin precipitaciones pluviales especialmente durante las últimas etapas de maduración del fruto. México tiene diversas regiones de su territorio con las condiciones climáticas óptimas para su cultivo. Según datos reportados por la SAGARPA, en los años 2012, 2013 y 2014, el estado de Hidalgo ocupa el tercer lugar en producción a escala nacional, no obstante el aprovechamiento por consumo directo del fruto es bajo y la cáscara como residuo corresponde al 50% del fruto. Se han aislado algunos metabolitos presentes en cáscara de granada, tal es el caso de punicalagina y ácido elágico, de los cuales existen reportes de su acción antioxidante y quimiopreventiva significativa *in vitro*. No obstante, son pocas las investigaciones en relación a esta propiedad y las evidencias preclínicas no son concluyentes del efecto quimiopreventivo; por lo cual en este estudio se pretende establecer si existen componentes bioactivos antioxidantes y quimiopreventivos procedentes de las variedades endémicas de granada para contribuir al cuerpo de evidencias que permitan determinar si los componentes de la cáscara de la granada proveniente de la comunidad de Ixmiquilpan del estado de Hidalgo podrían conferir actividad quimiopreventiva y antioxidante significativa frente a agentes mutagénicos con actividad similar a la de la doxorubicina.

## III. HIPÓTESIS

Si el EMC, EMP y EBJ poseen actividad antioxidante *in vitro*, efectos antígenotóxicos y antioxidantes *in vivo*, entonces se evidenciará su actividad antioxidante mediante el ensayo que utiliza dos radicales catiónicos ABTS<sup>•+</sup> y DPPH<sup>•</sup>, asimismo el extracto con mayor eficacia antioxidante reflejará ausencia de toxicidad aparente y genotoxicidad, pero una eficacia antígenotóxica significativa e incluirá un efecto antioxidante sérico *in vivo*.



*Evaluación quimiopreventiva de la granada (*Punica granatum L*) contra el daño producido por la doxorubicina*

## OBJETIVOS



## IV. OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto antígenotóxico de la cáscara de granada (*Punica granatum* L) contra el daño producido por la doxorubicina mediante el ensayo de micronúcleos en ratón CD1+.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Realizar extracciones butanólicas a partir de jugo y metanólicas de cáscara, y pericarpio de granada, por maceración y posterior rotaevaporación.
2. Determinar la capacidad de captura de radicales libres utilizando el ensayo de ABTS<sup>•+</sup> y DPPH<sup>•</sup> así como la cuantificación de fenoles totales por el método de Folin Ciocalteau de los extractos metanólicos y butanólicos.
3. Evaluar la toxicidad subcrónica del extracto con mayor actividad antioxidante *in vitro*, mediante el método de Lorke modificado.
4. Valorar el efecto genotóxico y citotóxico del EMC de granada mediante la prueba de micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica de ratón CD1+
5. Determinar si el mecanismo de acción antimutagénica se correlaciona con la capacidad antioxidante *in vivo*, mediante el ensayo de DPPH<sup>•</sup> en suero y peroxidación lipídica en homogeneizado de hígado y corazón.
6. Dilucidar la naturaleza química del extracto con actividad biológica mediante cromatografía en columna, capa fina, y <sup>1</sup>H-RMN.



*Evaluación quimiopreventiva de la granada ( *Punica granatum L* ) contra el daño producido por la doxorubicina*

## MATERIALES Y MÉTODOS



V. MATERIALES Y METODOS

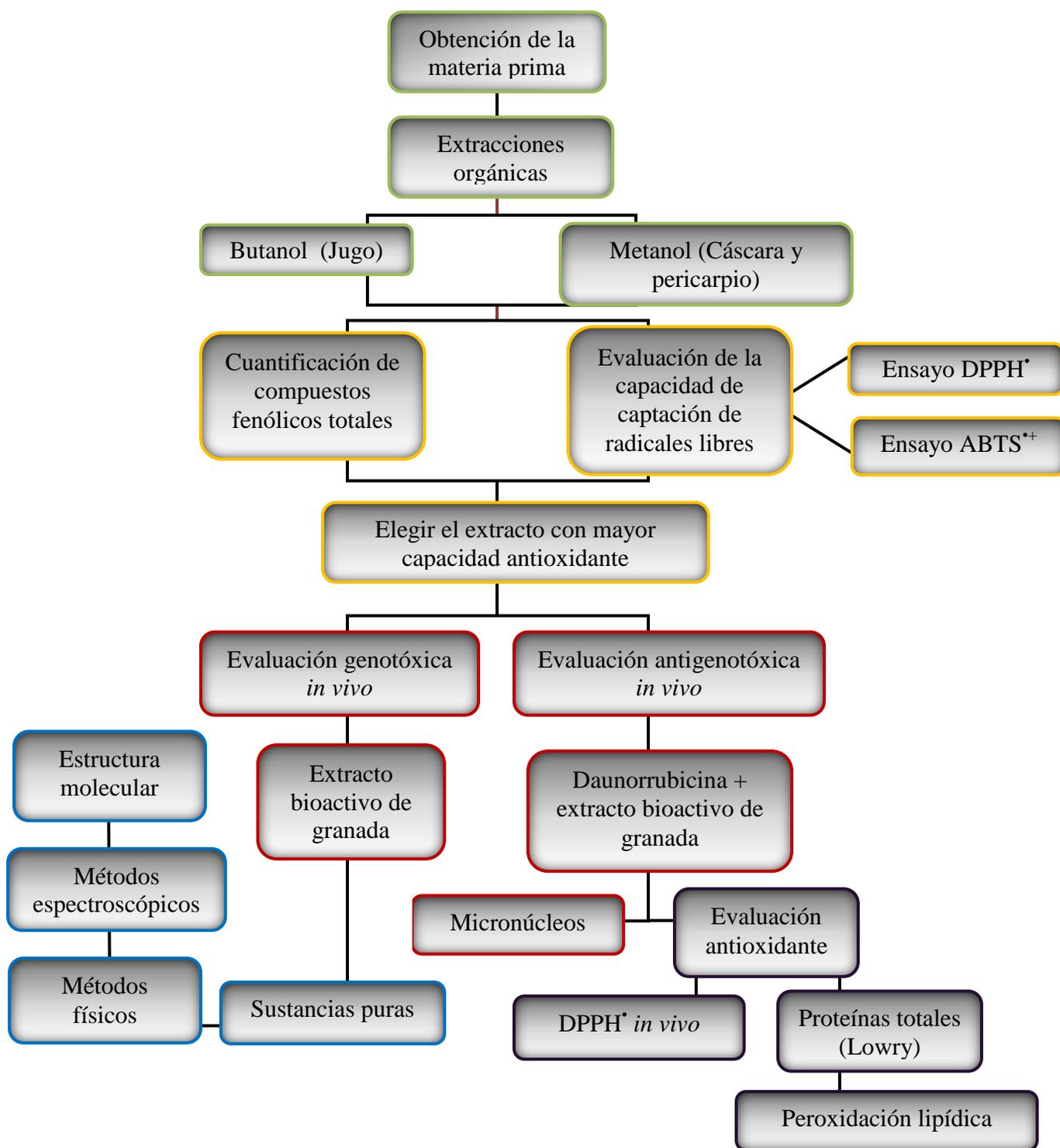


Figura 15. Diseño metodológico del proyecto.



## 5.1 TIPO DE ESTUDIO

El presente trabajo es de tipo experimental, prospectivo y longitudinal.

## 5.2 MATERIAL VEGETAL Y OBTENCIÓN DE EXTRACTOS DE GRANADA

La granada se obtuvo en la localidad el Nith de Ixmiquilpan Hidalgo que esta situada a 1.740 m de altitud sobre el nivel del mar, sus coordenadas geográficas son: longitud 20° 29' 20" y latitud -99° 11' 39". Se separaron manualmente la cáscara, pericarpio y arilo. La cáscara y pericarpio se dejaron secar, posteriormente se maceraron en metanol durante una semana, el arilo se licuó inmediatamente y se mantuvo en butanol durante 24h. Posteriormente las mezclas se filtraron y se llevaron a peso constante mediante el uso de un rotaevaporador a 40° C y 25 mBar de presión de vacío (arilo) y 337 mBar (cáscara y pericarpio).

## 5.3 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

De cada ensayo (ABTS<sup>•+</sup>, DPPH<sup>•</sup> y compuestos fenólicos totales) fueron realizadas 3 réplicas por muestra.

### 5.3.1 Actividad inhibidora del catión radical del ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS<sup>•+</sup>)

En esta prueba el ABTS se convierte en el catión radical azul ABTS<sup>•+</sup> por la adición de persulfato de potasio. Cuando el radical catión ABTS<sup>•+</sup> reacciona con antioxidantes como fenoles, tioles y vitamina C, se convierte de nuevo a su forma neutra incolora. A un volumen de 980 µL de ABTS<sup>•+</sup>, previamente ajustado con solución de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> hasta obtener una absorbancia a 734 nm de 0.7 +/- 0.02, se agregaron 20 µL de muestra, la mezcla se dejó incubar 30 min a temperatura ambiente y posteriormente se monitoreo el cambio de coloración por espectrofotometría (157, 158). Se construyó una curva de calibración con vitamina C para extrapolar los valores obtenidos de cada extracto que se expresaron como mg equivalentes de vitamina C (EVC)/100 g de extracto.



### **5.3.2 Determinación de la actividad antiradical por el método 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH').**

Esta determinación se llevó a cabo por el método desarrollado por Brand-Williams *et al.* (159). Se basa en la reducción del radical estable DPPH' al reaccionar con un antioxidante que puede donar hidrógenos, proceso que se manifiesta con un cambio en la coloración (de violeta intenso a amarillo claro). Se mezclaron 200 µL de muestra y 1 mL de DPPH' AL 7.5%, se dejó incubar durante 1 h a temperatura ambiente. Los cambios en la coloración fueron medidos a 517 nm en un espectrofotómetro de luz UV-Vis Epoch. Se construyó una curva de calibración con Trolox para extrapolar los valores obtenidos de cada extracto que se expresaron como mg equivalentes de Trolox (ET)/100 g de extracto.

## **5.4 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES**

El método espectrofotométrico desarrollado por Folin y Ciocalteau (160, 161) para la determinación de fenoles totales, se fundamenta en su carácter reductor. Se utiliza como reactivo una mezcla de ácidos fosfowolfrámico y fosfomolibdico en medio básico, que se reducen al oxidar los compuestos fenólicos, originando óxidos azules de wolframio ( $W_8O_{23}$ ) y molibdeno ( $Mo_8O_{23}$ ). La mezcla de reacción se preparó con 100 µL de cada muestra, 500 µL de reactivo de Folin Ciocalteau al 10% y 400 µL de bicarbonato de sodio al 7.5% y fueron incubadas a temperatura ambiente durante 30 min. La absorbancia del color azul desarrollado se midió a 765 nm en un espectrofotómetro de microplacas. Epoch de doble haz UV-Vis. Se realizó el mismo procedimiento con ácido gálico para construir la curva de calibración. Se extrapolaron los valores obtenidos de cada extracto en la curva de calibración y se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico (EAG)/100 g de extracto.

## **5.5 ADQUISICIÓN DE ANIMALES Y POBLACIÓN DE ESTUDIO**

El protocolo experimental fue aprobado por el comité de ética institucional (CIECUAL), previo a su realización. El trabajo con animales de experimentación se realizó bajo los lineamientos de cuidado animal establecidos por el Bioterio del ICSa de la UAEH que a su vez están basados en la NORMA Oficial Mexicana para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio NOM-062-ZOO-1999 (162). Se usaron ratones macho CD1+ procedentes del



Bioterio del ICSa de la UAEH, con un peso aproximado de 25-30 g, que se mantuvieron con ciclos de luz de 12x12, alimentados con Rodent Lab Chow Purina y agua purificada.

### **5.6 DETERMINACIÓN DE LA DL<sub>50</sub> DEL EXTRACTO GRANADA.**

Se determinó la DL<sub>50</sub> por el método de Lorke (163) modificado con la finalidad de establecer las dosis subcrónica a evaluar del extracto de granada. Para este procedimiento se administró a los ratones el EMC por vía i.g. en dosis de 10, 100 y 1000 mg/kg durante 15 días en la primera etapa; y de 1600, 2900 y 5000 mg/kg durante 15 días en la segunda etapa, observándolos durante 15 días posteriores para detectar posibles cambios de comportamiento o signos de anormalidades tales como piloerección, inactividad, anormalidades en las heces, inactividad física, pérdida de peso o mortandad.

### **5.7 EVALUACIÓN DE LA GENOTOXICIDAD Y ANTIGENOTOXICIDAD DEL EXTRACTO DE GRANADA**

La administración del extracto de granada se realizó por vía i.g cada 24 h durante 15 días y la Dau y Dox en una dosis única por vía intraperitoneal (i.p.). Los animales se distribuyeron de manera aleatoria en grupos de 6 ratones cada uno: grupo control negativo vehículo, grupo control positivo tratado con Dox (10 mg/kg) vía i.p. y Dau (3 mg/kg) vía i.p y tres grupos administrados con diferentes dosis del extracto de granada (7,70 y 700 mg/kg) vía i.g. con el objetivo de corroborar la ausencia de genotoxicidad.

Para el ensayo antigenotóxico se utilizaron tres grupos más tratados con los extractos de granada a los que se administraron media hora después Dox (10 mg/kg) (Tabla 4). Cada 48 h se recolectaron muestras de sangre periférica de todos los animales incluidos en el estudio, partiendo del tiempo basal, realizando frotis por duplicado. Al término del tratamiento se obtuvieron muestras de sangre para determinar actividad antioxidante en suero por el método de DPPH' y se sacrificó a los animales para obtener hígado y corazón y determinar proteínas totales por el método de Lowry y peroxidación de lípidos.

Se calculó el índice de genotoxicidad determinado por la frecuencia de eritocitos normocrómicos micronucleados (ENCMN) en 1000 eritocitos normocrómicos (ENC) (ENCMN/1000ENC) y el índice de citotoxicidad, que fue calculado como la relación de eritocitos policromáticos en 1000 ENC (EPC/ENC).



Tabla 4. Distribución de los grupos de animales utilizados en el ensayo.

NEGATIVO	POSITIVO	GENOTÓXICO y CITOTÓXICO (EMC)			ANTIGENOTÓXICO (EMC+Dox) 3era etapa		
Vehículo	Dau (3 mg/kg)	1era etapa			Dox (10 mg/kg)		
		10 mg/kg	100 mg/kg	1000 mg/kg	EMC		
	Dox (10 mg/kg)	2da etapa			7 mg/kg	70 mg/kg	700 mg/kg
		1600 mg/kg	2900 mg/kg	5000 mg/kg			

En base a estos resultados se eligió el tiempo en que se observó el mayor daño genotóxico para obtener muestras de hígado, corazón y sangre para determinación de peroxidación lipídica en homogeneizado de hígado y corazón por medio de la cuantificación de MDA y determinación de la actividad antirradical en suero con DPPH<sup>•</sup>.

### 5.8 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIRRADICAL EN SUERO POR EL MÉTODO 2,2-DIFENIL-1-PICRILHIDRAZIL (DPPH<sup>•</sup>).

Esta prueba se llevó a cabo por el método de Chrzczarnowicz *et al.* (164). Se obtuvo el suero por centrifugación de las muestras a 3800 rpm a 4°C durante 10 min. Entonces se mezclaron 200 µL de suero con 200 µL de acetonitrilo 9.5 M y se centrifugó durante 10 minutos a 9450 rpm a 4°C durante 10 min. Posteriormente se agregaron 25 µL del sobrenadante (suero desproteinizado), a 5 µL del DPPH<sup>•</sup> 0.01 M más 970 µL de metanol midiendo la absorbancia a 517 nm después de 30 minutos de incubación en la oscuridad.

### 5.9 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES POR EL MÉTODO DE LOWRY

Se determinó la concentración de proteínas de las muestras eluidas mediante el método de Lowry (165). El principio del método se basa en la reactividad del péptido nitrógeno con cobre bajo condiciones alcalinas y la subsiguiente reducción del Folin-Ciocalteu y el ácido fosfomolibdico fosfotúngstico. Se requirieron las siguientes soluciones: Solución A: Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>



al 2% y tartrato de sodio al 0.02% en NaOH 0.1 N. Solución B: CuSO<sub>4</sub> al 0.5% en agua destilada. Solución C: 50 mL de la solución A + 1 mL de la solución B. Solución D: Reactivo de Folín-Ciocalteu en una proporción 1:1 en agua destilada. Se realizó una dilución 1:100 del plasma de cada muestra con NaCl 0.15 M, se tomaron 100 µL de esta dilución y se mezclaron con 150 µL de agua destilada y 1 mL de la solución C dejándose reposar durante 10 minutos, después se agregaron 100 µL de la solución D, se mezcló vigorosamente dejando incubar durante 45 minutos; posteriormente se leyeron las absorbancias a 550 nm. Las lecturas obtenidas se interpolaron en una curva tipo realizada con albúmina sérica bovina a una concentración de 1 mg/mL.

### 5.10 PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN HÍGADO Y CORAZÓN

Se realizó de acuerdo al método establecido por Buege y Aust (166) con modificaciones. Inicialmente se adicionaron 500 µL de homogeneizado del órgano, se completó a 1 mL con Tris HCl pH 7.4 0.01M, enseguida se agregaron 2 mL de TBA 0.375% disuelto en TCA al 16%. Las mezclas se llevarón a ebullición en baño maría durante 15 min, para ser enfriadas sobre hielo durante 10 min e inmediatamente centrifugadas a 4150 rpm durante 10 min a 4° C. Finalmente, se determinó la absorbancia del sobrenadante a 535 nm. Los resultados se expresaron en ng de MDA/mg de proteína/g tejido hepático.

### 5.11 PURIFICACIÓN DEL PRINCIPIO ACTIVO

La cromatografía es uno de los medios más útiles para la separación e identificación de componentes de los productos naturales. En la cromatografía, la mezcla se separa por la distribución diferencial de los componentes entre una fase estacionaria y una fase móvil. Uno de los principales tipos es la cromatografía de adsorción la cual utiliza materiales adsorbentes inertes (por ejemplo, gel de sílice o alúmina) como fase estacionaria, y los disolventes orgánicos como la fase móvil. La separación de la mezcla, a continuación, se consigue mediante las diferencias en la polaridad de los componentes individuales (167).

#### 5.11.1 Cromatografía en capa fina

Con ayuda de un tubo microcapilar se colocó una alícuota del extracto disuelto en metanol sobre una cromatoplaqueta como un único punto pequeño cerca de un extremo. La placa se



colocó dentro de una cámara con una pequeña cantidad de disolvente, se probaron diferentes mezclas para obtener variadas polaridades que permitieran el despegue y separación de los compuestos a través de la cromatopla. El disolvente asciende a través de la placa por acción capilar, llevando los componentes de la muestra con ella. De esta manera se eligieron las condiciones para realizar la cromatografía en columna.

### **5.11.2 Cromatografía en columna**

Se preparó una columna vertical de vidrio, con sílica gel como fase estacionaria, se añadió el extracto impregnado en sílica en la parte superior de la columna, y como fase móvil solución de cloroformo: metanol a polaridad creciente: 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1 y finalizando únicamente con metanol. Se recolectaron 37 eluciones, las cuales se dejaron evaporar y se analizaron las eluciones obtenidas mediante RMN.

### **5.11.3 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear**

La resonancia magnética nuclear es un método espectral basado en las propiedades magnéticas de los núcleos y, en su aplicación más común, en las propiedades del núcleo de hidrógeno. Los electrones producen modificaciones, débiles pero observables siendo esos efectos electrónicos los que darán lugar a los desplazamientos químicos y a las constantes de acoplamiento, permitiendo así el estudio detallado de la estructura electrónica de las moléculas (168). Se disolvió una pequeña cantidad del EMC en metanol-d<sub>4</sub>, se utilizó un espectrómetro de RMN JOEL. Se realizaron los experimentos de RMN de hidrógeno (<sup>1</sup>H-RMN).

## **5.12 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los datos con sus réplicas fueron descritos como la media  $\pm$  la desviación estándar ( $X \pm DE$ ) para las pruebas *in vitro* y la media  $\pm$  el error estándar de la media ( $X \pm SEM$ ) para los datos *in vivo*, se considero un valor de  $p \leq 0.05$  como significativo. La comparación de más de dos grupos se realizó con un análisis de varianza (ANOVA) y la diferencia entre los grupos de tratamiento se determinó con la prueba de Tukey-Kramer. Los análisis se realizaron con el programa SigmaStat versión 3.0 (Systat Software Inc, 2008).



# RESULTADOS



## VI. RESULTADOS

### 6.1 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS

Se partió de 7000 g de arilo fresco, 1400 g de cáscara y 1525 g de pericarpio obteniendo al finalizar el proceso de rotaevaporación el extracto butanólico de jugo (EBJ), metanólico de cáscara (EMC) y metanólico de pericarpio (EMP) (**Figura 16**). Los porcentajes de rendimiento obtenidos fueron de 15.8 para el EMC, de 12.26 para el EMP, y de 0.46 para el EBJ (**Tabla 5**).



Figura 16. Procedimiento general de obtención de extractos: EMC, EMP Y EBJ.

Tabla 5. Porcentaje de rendimiento de cáscara, arilo y pericarpio de granada

Parte de granada	g de extracto	% de rendimiento
Cáscara (1400 g)	222.26	15.8
Arilo (7000g)	32.54	0.46
Pericarpio (1525g)	187	12.26

### 6.2 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y CUANTIFICACIÓN DE FENOLES TOTALES

Se determinó la capacidad de captación de radicales libres por ensayo ABTS<sup>•+</sup> Y DPPH<sup>•</sup> y fenoles totales por el método de Folin Ciocalteu. En la **Figura 17** se muestran los resultados de estas determinaciones para el arilo de granada con semilla y sin semilla y en la **Figura 18** se muestran los resultados comparativos para el caso de los extractos: EMC, EBJ y EMP.



El contenido de fenoles totales del jugo de granada con semilla se cuantificó alrededor de 8000 EAG/L superando al contenido de fenoles en el jugo sin semilla. El EMC presentó tanto el mayor contenido de fenoles totales como de actividad antioxidante seguido por el EMP y finalmente el EBJ, en ambas técnicas utilizadas.

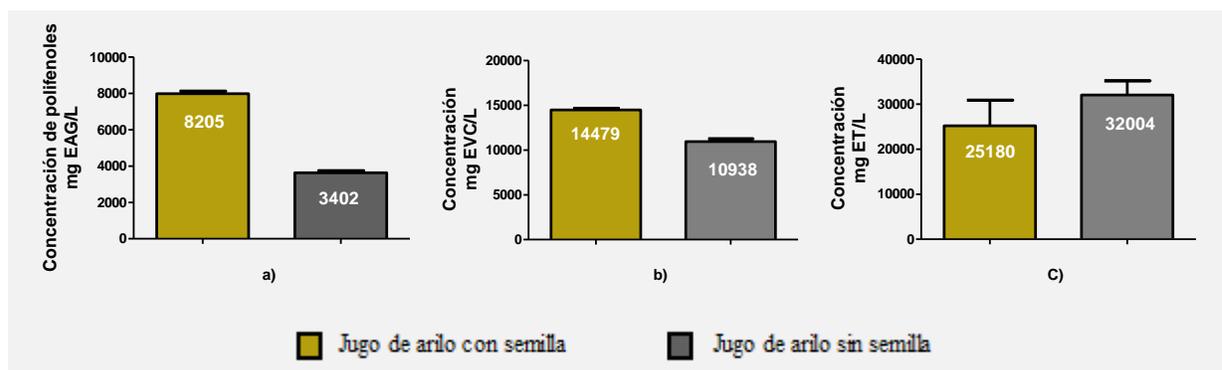


Figura 17: a) Cuantificación de fenoles totales por Folin Ciocalteu, y capacidad antirradical mediante reacción con b) DPPH• y con c) ABTS•+ en jugo de arilo con y sin semilla.

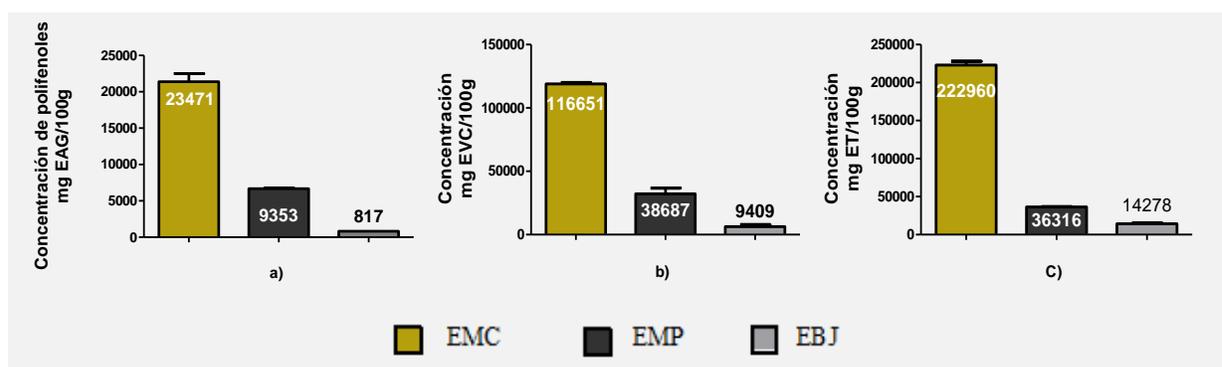


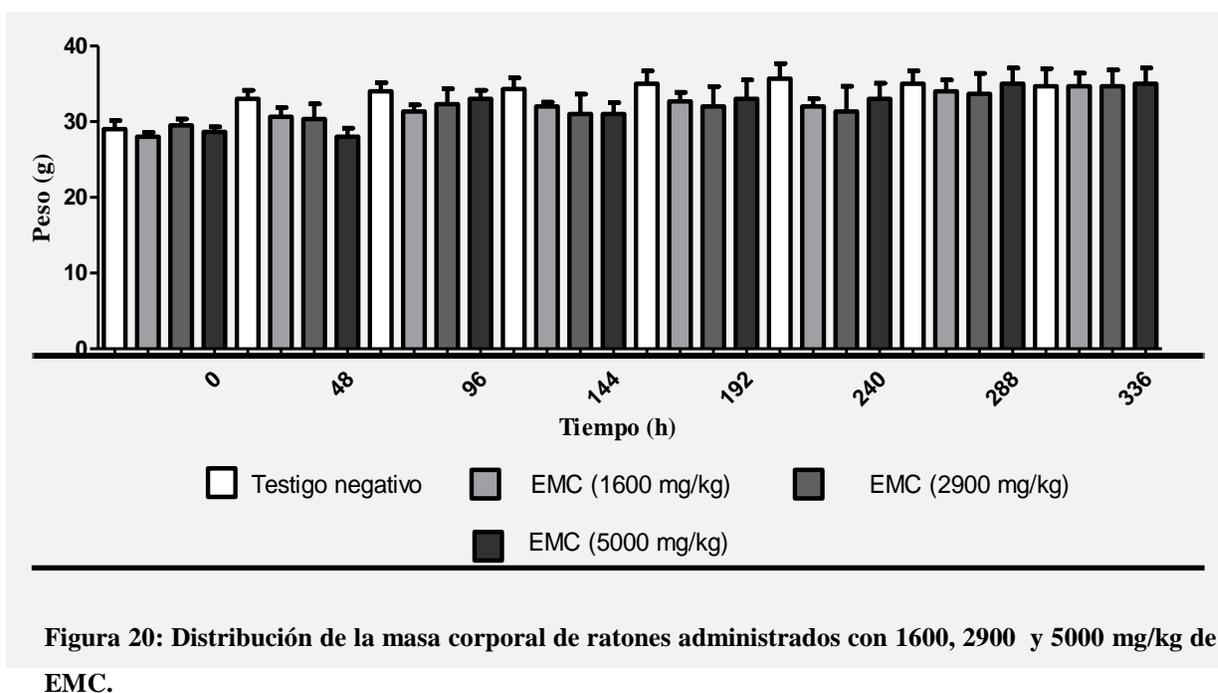
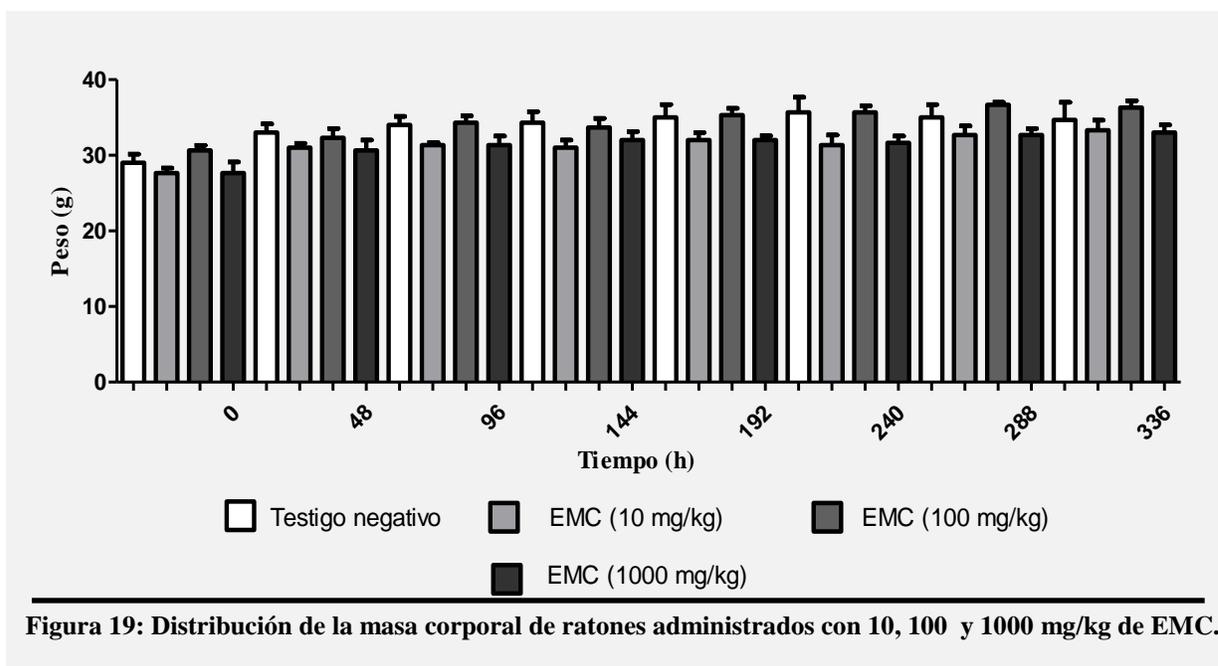
Figura 18: a) Cuantificación de fenoles totales por Folin Ciocalteu, y capacidad antirradical mediante reacción con b) DPPH• y con c) ABTS•+ en EMC, EMP y EBJ.

### 6.3 DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL MEDIA (DL<sub>50</sub>) DEL EXTRACTO DE GRANADA.

En base a los resultados anteriores se elige al extracto de cáscara para la evaluación *in vivo*. Después de la administración subcrónica en ratón CD1+ del extracto a dosis de 10, 100 y 1000 mg/kg de masa en una primera fase y de 1600, 2900 y 5000 mg/kg durante 15 días en una siguiente fase; no se presentaron síntomas o alteraciones en la conducta, el peso de los animales se mantuvo en constante aumento con todas la dosis administradas (Figura 19 y 20),



tampoco se registró muerte a lo largo del tiempo, en ambas fases; por lo cual se estableció que la dosis letal media es superior a 5000 mg/kg.

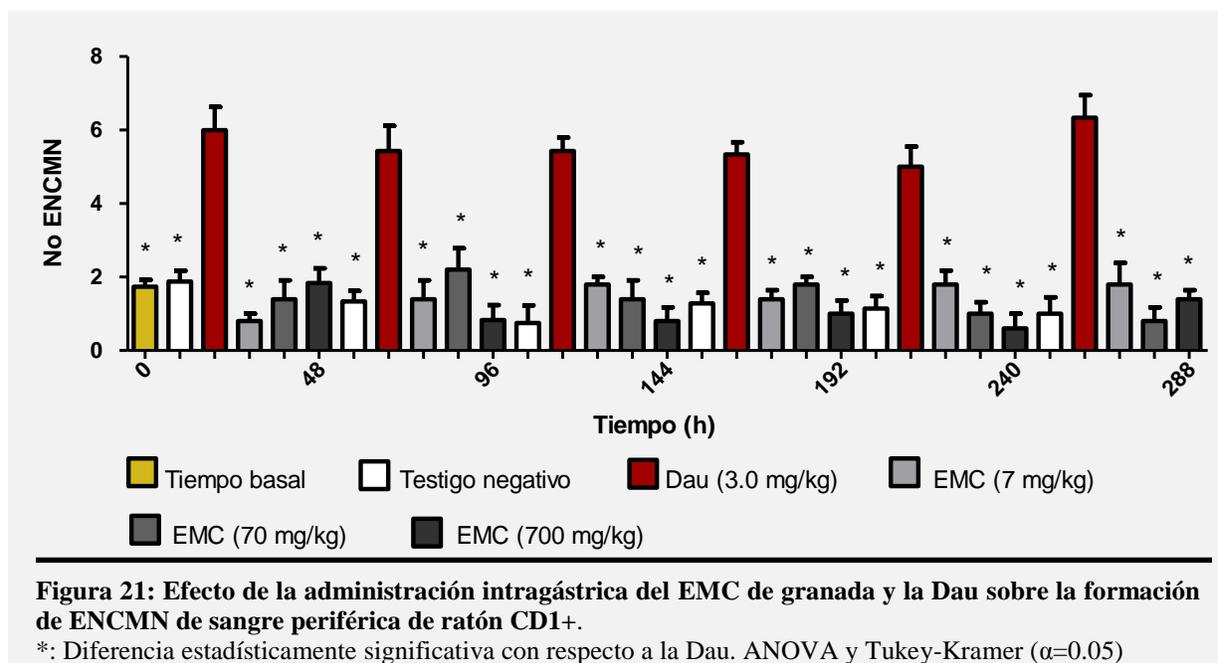


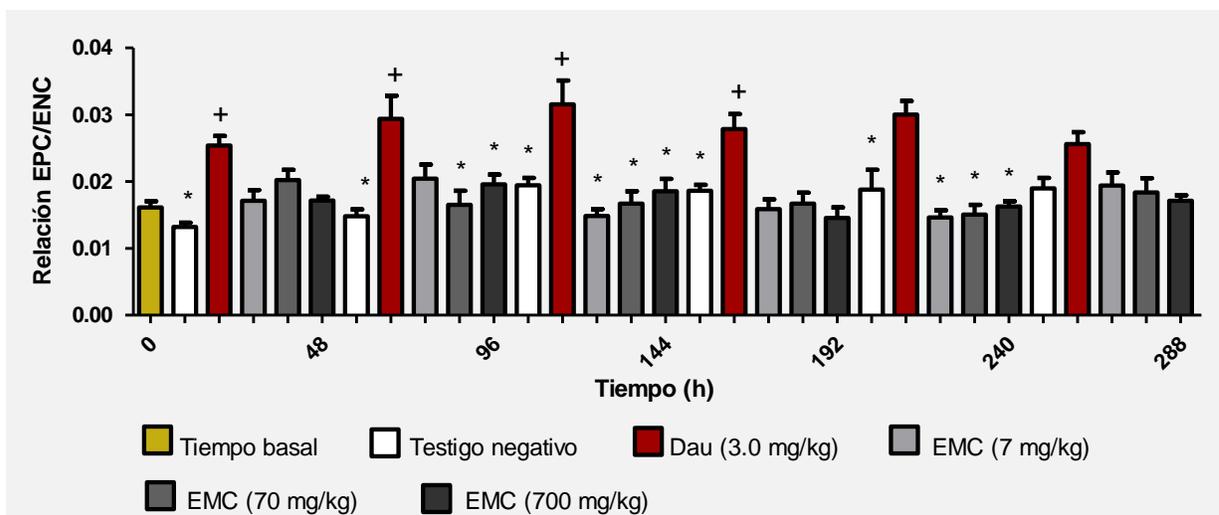
## 6.4 EVALUACIÓN DE LA GENOTOXICIDAD Y ANTIGENOTOXICIDAD DEL EXTRACTO DE GRANADA

### 6.4.1 Genotoxicidad y citotoxicidad

En la **Figura 21** se muestran los valores promedio de la frecuencia de MN al administrar el EMC a ratones macho, dichos valores se obtuvieron al cuantificar 1000 EPC por individuo. Se aprecia que las 3 dosis del EMC (7, 70 Y 700mg/kg) no presentaron diferencias significativas comparadas con el valor obtenido del testigo negativo (agua) de sus tiempos respectivos. Por el contrario la dosis empleada de Dau (3mg/kg) mostró un incremento desde las 48h 3.2 veces con respecto al testigo negativo. El resultado establece que el EMC no indujo MN a lo largo del tiempo y confirma la capacidad clastogénica de la Dau.

En la **Figura 22** se representa la citotoxicidad (EPC/ENC en 1000 eritrocitos totales). Los resultados muestran que ninguna de las tres dosis del EMC presenta diferencias significativas en relación al testigo negativo, por lo tanto se concluye que el EMC no modificó la eritropoyesis. Por el contrario con Dau se observó un aumento de 1.9 veces en la relación EPC/ENC con respecto al testigo negativo, a partir de las 48h, mostrando un efecto máximo a las 144h.





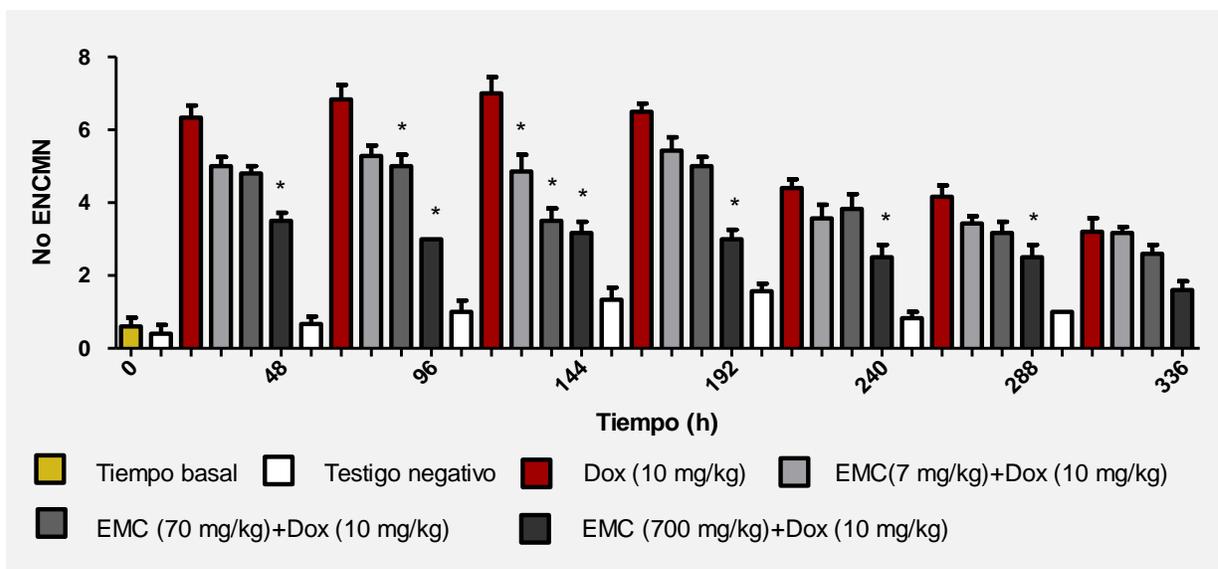
**Figura 22: Efecto del EMC sobre la relación EPC/ENC en sangre periférica de ratón y por Dau.** Diferencias estadísticamente significativas con respecto al testigo de Dau (\*) y vehículo (+). Pruebas ANOVA y Tukey- Kramer ( $\alpha=0.05$ )

#### 6.4.2 Antigenotoxicidad

En la **Figura 23** se observa que la frecuencia de ENCMN aumentó 15.8 veces a las 48 h con respecto al testigo negativo. Las tres dosis del EMC disminuyen la frecuencia de ENCMN, sin embargo se encontró una inhibición máxima del 30% con la dosis de 7 mg/kg al tiempo 144, del 50% con la dosis de 70 mg/kg en el tiempo 144 y con la dosis de 700 mg/kg una inhibición máxima del 56% al tiempo 96 siendo éstas estadísticamente significativas.

A las 144 h la Dox produjo el mayor efecto genotóxico, con una media de 7 ENCMN, en el mismo intervalo los animales tratados con las tres dosis de EMC más Dox mostraron diferencias estadísticamente significativas al compararse con el grupo tratado únicamente con el mutágeno, es decir, las tres dosis presentaron efecto antigenotóxico: la dosis de 7mg/kg de EMC redujo la frecuencia de ENCMN un 30.95%, con la dosis de 70 mg/kg la inhibición fue de 50% y para la dosis de 700mg/kg de 54.76%. Finalmente se observa que a las 336 h ya no se aprecian diferencias significativas al comparar el efecto de la mezcla del mutágeno/antimutágeno con respecto al testigo positivo.



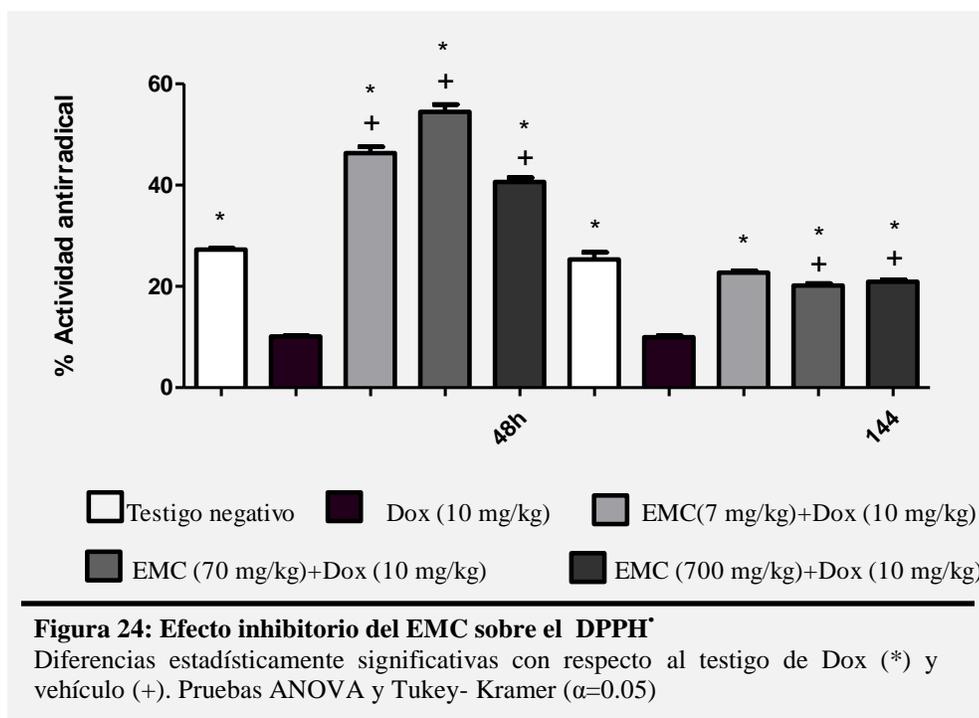


**Figura 23: Efecto inhibitorio del EMC sobre la frecuencia de ENCMN producidos por Dox.** Diferencias estadísticamente significativas con respecto al testigo de Dox (\*) y vehículo (+). Pruebas ANOVA y Tukey- Kramer ( $\alpha=0.05$ )

### 6.5 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIRRADICAL EN SUERO POR EL MÉTODO 2,2-DIFENIL-1-PICRILHIDRAZIL (DPPH').

Los resultados de la actividad antirradical o promoción de la decoloración de DPPH' a las 48 y 144 h se muestran en la **Figura 24**, en ella se observa que el grupo control positivo tuvo una media de 10.12% el cual es significativamente más bajo que en el testigo negativo cuya media resultó de 27.28%, y que a las 48 h de tratamiento con los extractos a dosis de 7, 70 y 700 mg/kg ( 46.3, 54.4 y 40.6% respectivamente), es notable su aumento, presentando diferencia estadísticamente significativa entre todas las dosis combinadas con respecto a la actividad antirradical menor en el lote administrado con la Dox y mayor al grupo negativo. A la 144 h los testigos positivo y mantienen su diferencia, con valores promedio de 9.7 y 25.3% respectivamente, los grupos de tratamiento en este caso muestran porcentajes más bajos que en el anterior 22.5, 20.5 y 21.2% para las dosis de 7, 70 y 700 mg/kg, sin embargo aún existe diferencia significativa de todos los grupos con respecto al tratado con Dox.



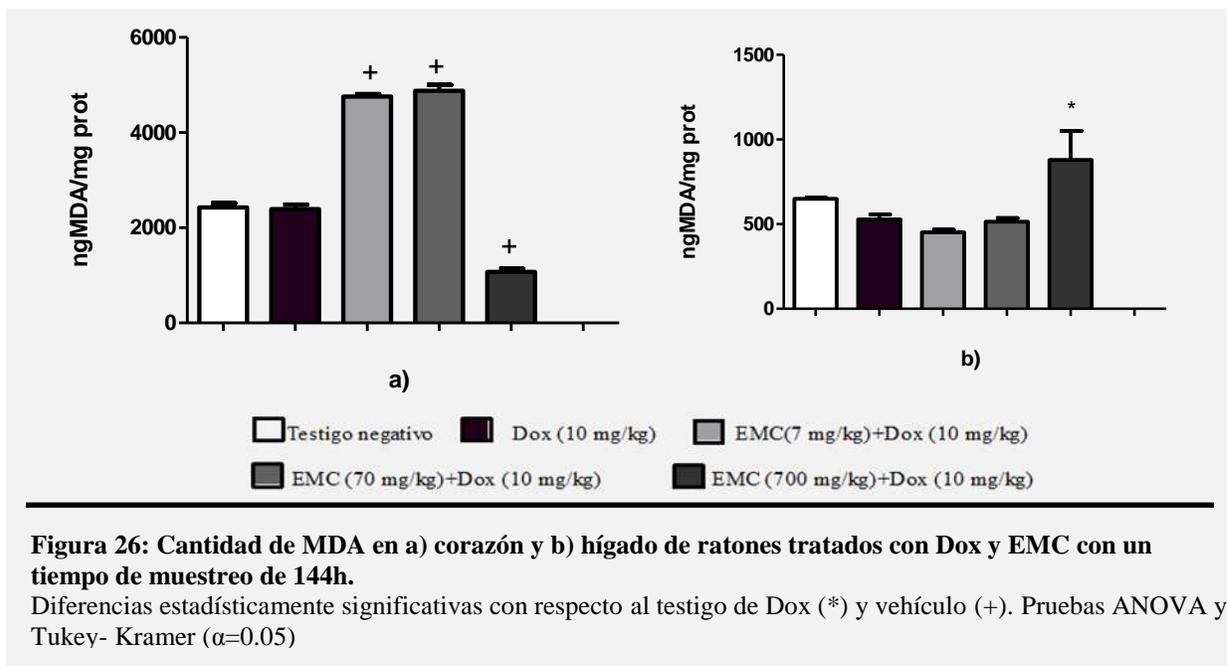
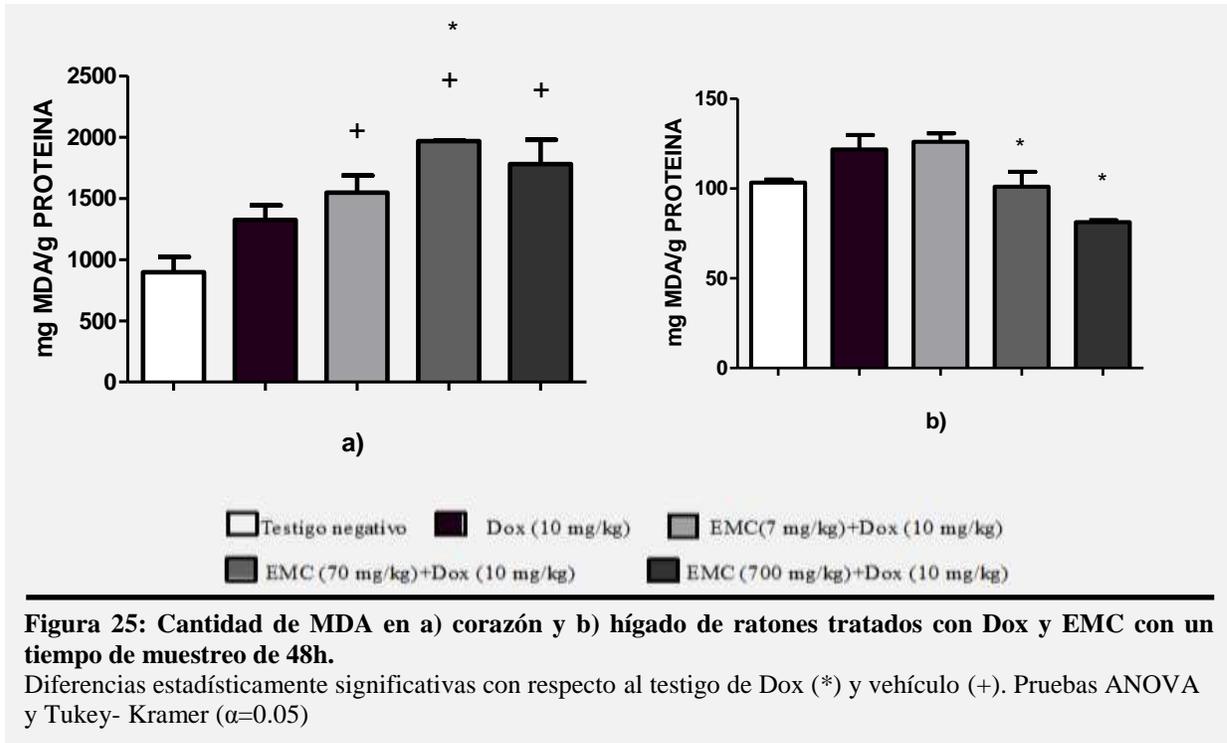


## 6.6 PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN HÍGADO Y CORAZÓN

En la **Figura 25** se presentan los resultados de la peroxidación lipídica determinada por la presencia de malondialdehído en a) corazón y b) hígado a un tiempo de muestreo de 48 h. No se observa diferencia significativa entre grupos control positivo y negativo en ambos órganos. Los grupos de tratamiento en hígado muestran disminución en la cantidad de MDA con referencia al grupo control positivo, siendo ésta, estadísticamente significativa para la dosis mayor del extracto 700 mg/kg; de igual manera existe esta diferencia entre las dosis menor y mayor del extracto.

Las determinaciones de MDA a las 144 h se grafican en la **Figura 26**, no hay diferencia estadísticamente significativa entre grupos control positivo y negativo.





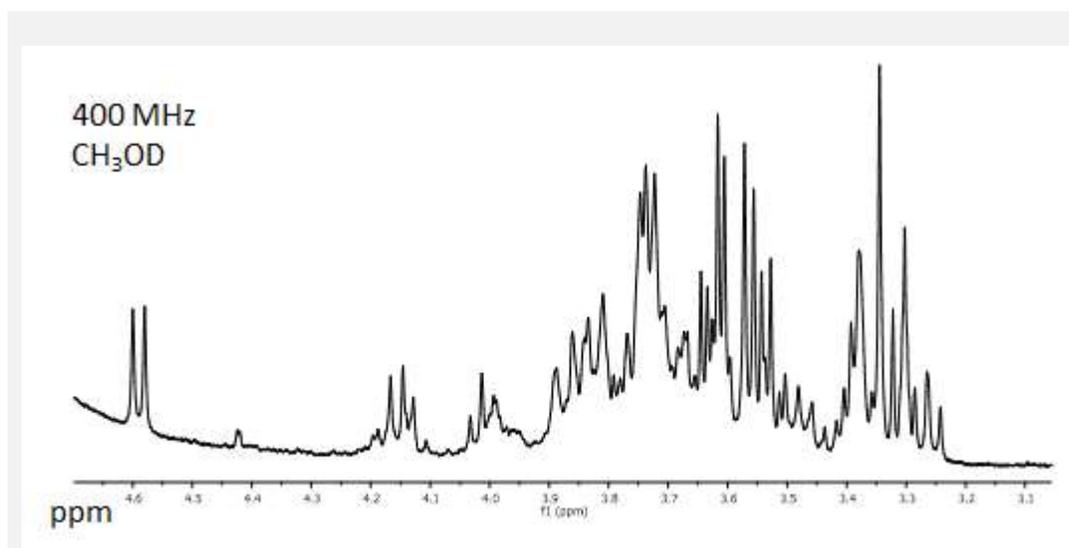
### 6.7 PURIFICACIÓN DEL PRINCIPIO ACTIVO.

Hasta el momento se ha realizado cromatografía en columna del EMC (**Figura 27**) con la finalidad de aislar el compuesto mayoritario, se obtuvieron cristales de la elusión no. 10, su espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (**Figura 28**) presuntamente parece indicar que se trata de un compuesto glicosilado por la presencia de la señal doble aproximadamente a 4 ppm que corresponde al protón anomérico del azúcar, en las demás ppm se encuentran los protones base de OH.



**Figura 27: Cromatografía en columna del EMC.** Se utilizó sílica como fase estacionaria, el extracto de granada impregnado en sílica y como fase móvil solución de cloroformo: metanol a polaridad creciente: 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1 y finalizando únicamente con metanol.





**Figura 28:** Espectro de <sup>1</sup>H-RMN de la elución número 10 del EMC. Las dos primeras señales que se observan entre 4.5 y 4.6 ppm corresponden al protón anomérico de un azúcar, el resto a los protones bases de OH.



*Evaluación quimiopreventiva de la granada ( *Punica granatum L*) contra el daño producido por la doxorubicina*

## DISCUSIÓN



## VII. DISCUSIÓN

### 7.1 OBTENCIÓN Y EVALUACIÓN ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE GRANADA

Los antioxidantes han atraído mucho interés debido a su efecto protector contra la reacción de los radicales libres que pueden ser la causa de muchas enfermedades incluyendo el cáncer (84, 169-171). En recientes años, han surgido diversos reportes sobre las propiedades benéficas a la salud que tiene la granada (2, 13, 77, 172, 173). Este estudio se centró en obtener extractos de granada y determinar su capacidad antioxidante y antigenotóxica; los porcentajes de rendimiento del EBJ, EMP y EMC fueron de 0.46, 12.26 y 15.8 respectivamente; Zahin *et al.* obtuvieron fracciones extraídas secuencialmente con diferentes solventes, resultando un porcentaje de rendimiento de 10.2 de la fracción metanólica de cáscara, por lo cual se decidió en este estudio obtener las fracciones metanólicas de cáscara y pericarpio. Por otra parte, fracciones butanólicas obtenidas en nuestro laboratorio tuvieron actividad antibacteriana y probablemente esta propiedad está relacionada con su contenido de polifenoles y con la actividad antioxidante (174). El contenido de polifenoles más alto para el caso de los jugos se encontró en el jugo de arilo con semilla con alrededor de 8000 mgEAG/L, que es superior a otras bebidas como el vino tinto (3500 mgEAG/L) e incluso el arándano (2300 mgEAG/L) (175). El EMC (23471 mgEAG/100g) también resultó con el contenido más elevado de polifenoles con respecto a EBJ (817 mgEAG/100g) y EMP (9353 mgEAG/100g) e inclusive a los jugos; a su vez Negi y Jayaprakasha (58) encontraron que el contenido de polifenoles de un extracto metanólico de cáscara determinado por el método de Folin Ciocalteu modificado fue de 46.2% sólo superado por la fracción en acetona cuyo contenido fue de 52%. El alto contenido de polifenoles en el EMC coincide con su alta capacidad de captación de radicales libres (DPPH<sup>•</sup> 116651 mgEVC/100g y ABTS<sup>•+</sup> 222960 mgET/100g) debido a que estos valores son los más elevados encontrados en ambas técnicas y se encuentran por encima de los demás extractos y jugos frescos evaluados en este estudio, Zahin *et al.* (73) reportaron una alta actividad antioxidante *in vitro* de la fracción metanólica de cáscara determinada por los ensayos DPPH<sup>•</sup> (90.53% de inhibición), y fosfomolibdeno (5067.7  $\mu$ molEVC/g). Sherwin *et al.* (176) reportan una correlación similar de la actividad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos, los autores proponen que estos compuestos actúan a través de su



capacidad de donar hidrógeno, e interrumpir la cadena de generación de radicales libres de oxidación, formando de ese modo un producto final estable que bloquea la oxidación de biomoléculas.

Por otro lado, el poder reductor refleja la capacidad donadora de electrones de los compuestos bioactivos que se asocia con la actividad antioxidante (177). Algunos de estos compuestos bioactivos han sido aislados de diferentes partes de la planta, en la cáscara de diferentes frutos los más abundantes son los flavonoides y taninos como punicalagina, punicalina, ácido gálico, ácido elágico y glucósidos de ácido elágico (24, 72, 74, 178-180).

En este estudio se utilizó el agente mutágeno Dau, que como uno de sus principales mecanismos de acción implica la producción de la especie más reactiva del oxígeno como lo es el OH• capaz de atravesar la membrana celular y causar daño citogenético, el fármaco es capaz de llegar a médula ósea lo cual resulta en la formación de MN en los eritrocitos ya sea fragmentos de cromosomas rezagados o cromosomas enteros, se observa su presencia en el citoplasma celular y han sido señalados como eficientes indicadores de daño genético producido por agentes clastogénicos y aneugénicos. Los eventos genotóxicos causados por este tipo de agentes son considerados como una etapa crucial en la iniciación de la carcinogénesis. Además en Kang *et al.* han sugerido que el aumento de resultados de la frecuencia de MN está relacionado con un paso temprano en carcinogénesis (181).

## 7.2 ESTUDIO DE TOXICIDAD SUBCRÓNICA

Los resultados de la administración del EMC en los animales revelan la ausencia de efectos clínicos adversos y de mortandad durante 15 días de tratamiento en las dos fases del estudio, se estableció que la DL<sub>50</sub> del EMC fue superior a 5000 mg/kg. Estos resultados son similares a los encontrados por Patel *et al.* (182) quienes administraron un extracto estandarizado a 30% de punicalaginas durante 90 días a ratas Wistar y concluyeron, al no existir cambios en la examinación oftálmica, peso corporal, consumo de alimento, evaluación clínica patológica, peso de órganos y parámetros bioquímicos e histopatológicos, que la DL<sub>50</sub> oral es superior 5 g/kg.



### 7.3 EVALUACIÓN GENOTÓXICA Y CITOTÓXICA *in vivo*

El ensayo de MN en sangre periférica de ratones CD1+ fue utilizado en este estudio como bioindicador de daño inducido por los compuestos que se emplearon en la investigación (EMC, Dau, Dox) lo cual coincide con diversos estudios que indican que el análisis de MN en los eritrocitos constituye la manera eficaz de evaluar la afección de la actividad medular, así como la capacidad clastogénica de los compuestos a corto, mediano y largo plazo (183-185). En este sentido el tiempo de exposición a un xenobiótico es determinante para el tipo de célula a evaluar, se ha sugerido que en un estudio crónico o subcrónico las células a examinar deben ser los ENC, por presentar una vida media en circulación sanguínea de 30 días y por consiguiente indican el efecto acumulado por el xenobiótico. A diferencia de los estudios agudos, en los que los EPC son los mejores indicadores de daño debido a que el ciclo celular de los eritrocitos dura entre 10 y 20 horas, que la enucleación ocurre aproximadamente en 6 horas y que los EPC al ser células jóvenes tienen un tiempo de vida de 24 horas en la médula ósea (186, 187). En este trabajo se empleó ratón como modelo de estudio debido a que en un estudio realizado con la finalidad de determinar la frecuencia de eritrocitos micronucleados en 35 especies de mamíferos, se encontró que el ratón tuvo los valores más altos, por lo que se consideran un modelo adecuado como biomonitor del daño genotóxico (188).

Por otra parte los compuestos biológicamente activos han sido reconocidos por sus propiedades farmacológicas, pero muchos de ellos son de uso terapéutico limitado debido a sus propiedades toxicológicas, carcinogénicas y mutagénicas (154). El análisis de genotoxicidad es un aspecto importante del desarrollo de fármacos ya que la mayoría de las compañías farmacéuticas evalúan el potencial de un nuevo agente terapéutico basado en su genotoxicidad tanto *in vitro* como *in vivo* (189). En este sentido, la proyección de especies vegetales utilizadas popularmente y sus componentes aislados para la actividad mutagénica es necesaria e importante para el establecimiento de medidas de control adecuadas y más aún cuando se trata de componentes no utilizados comúnmente para la alimentación como es el caso de la cáscara de granada, que fue seleccionada por su valor antioxidante considerablemente mayor en comparación con los demás extractos y jugos.

El ensayo de MN demostró el daño genotóxico provocado por la administración de una dosis única de Dau y la ausencia de efecto sobre la frecuencia de MN en eritrocitos de ratón tratados con EMC, ya que los dos últimos lotes no presentaron diferencia estadísticamente



significativas comparadas con el testigo negativo en ninguna de las tres dosis y tiempos evaluados, ya que en éstas se encontraron medias que oscilaron entre 0.6 y 1.8 ENCMN/1000 ENC y el testigo negativo de entre 0.75 y 1.8 ENCMN/1000 ENC. Estos resultados demuestran que el EMC no es genotóxico en ratón lo que concuerda con un estudio previo en el que se administraron extractos etanólicos de hoja y fruto de granada por vía intragástrica a ratones Swiss, tampoco se reportaron efectos genéticos, ni tóxicos aparentes, en frotis de médula ósea (71). Sin embargo Sánchez *et al.* (70) reportaron lo contrario, ellos encontraron que un extracto hidroalcohólico del fruto a dosis  $\geq 70$  mg/kg por vía intraperitoneal en ratón Balb-C elevó la frecuencia de MN en células de médula ósea. Esto quizá pueda ser explicado debido a que la administración se llevó a cabo por vía intraperitoneal, evitando así que el metabolismo inicial del extracto se llevara a cabo en hígado, provocando que los componentes pasen directo a circulación y en un menor tiempo, acumulándose en el torrente sanguíneo y probablemente actuando como prooxidantes (190, 191).

Los resultados obtenidos con la Dau sugieren su genotoxicidad ya que produjo una elevación de la frecuencia de ENCMN desde las 48 h encontrando 6 ENCMN/1000 ENC, valor que presenta diferencia estadísticamente significativa con respecto a los valores del testigo negativo. Este incremento se observó claramente en todos los tiempos evaluados en comparación con su grupo testigo, y con su tiempo basal, es decir, antes de administrar los tratamientos. De esta manera se confirma la capacidad genotóxica de Dau que ha sido evaluada por otras pruebas *in vivo*: ensayo cometa (192) y micronúcleos (193, 194).

La citotoxicidad de los compuestos se evaluó mediante la relación EPC/ENC. El aumento o disminución de esta tasa sugiere una eritropoyesis alterada, por efecto del xenobiótico sobre el ciclo celular. En el presente estudio el EMC a diferentes dosis no produjo un aumento significativo de esta relación, con respecto al grupo testigo en ninguno de los tiempos evaluados. Se encontraron entre 14 y 20 EPC/1000ENC en los grupos administrados con el EMC, mientras que el grupo negativo resultó con valores de entre 13 y 19 EPC/1000ENC, lo cual nos permite inferir que el EMC no produce descontrol del ciclo celular que se refleje en aumento de la actividad de la médula ósea. Los resultados coinciden con los reportes de estudios previos, en los cuales se probaron componentes purificados (PG y AE), además de extractos de hoja, fruto entero y cáscara de granada por diferentes métodos como el ensayo de



Ames, MN, viabilidad y proliferación celular y aductos de ADN, encontrando ausencia de efectos mutagénicos contra CF, NaN<sub>3</sub>, MMS, 2AF y BP (58, 71, 74, 195).

Respecto a la Dau, se comprobó su citotoxicidad debido a que aumentó la frecuencia de EPC (25 y 31 EPC/1000ENC), valores que comparados con sus respectivos testigos negativos de cada tiempo muestran diferencia estadísticamente significativa. Además se encontró el pico máximo de aumento a las 144 h con 31 EPC/1000ENC. Este aumento indica que la Dau genera un aumento en la actividad mitótica de la médula ósea, lo cual difiere con un estudio en el que se reporta la disminución en la frecuencia de EPC lo que indica la inhibición de la actividad medular (194). Esta citotoxicidad de Dau, puede ser explicada por diferentes mecanismos: Inhibición de la topoisomerasa II, intercalación de Dau al ADN celular, la toxicidad mediada por radicales libres causados por el ciclo redox del radical semiquinona o la formación de especies reactivas del oxígeno por el complejo Dau-Hierro (75).

#### 7.4 EVALUACIÓN ANTIGENOTÓXICA *in vivo*.

Las mutaciones pueden conducir a enfermedades relacionadas con la edad, incluyendo el cáncer que se ha convertido en la primera causa de muerte, por ello se ha centrado mucha atención en su quimioprevención, con poco éxito. Por lo tanto, las investigaciones enfocadas a la búsqueda de sustancias de plantas medicinales que puedan servir para proteger contra mutágenos químicos o carcinógenos que actúan como iniciadores del proceso cancerígeno. La granada se ha reportado como agente anticancerígeno, y esa propiedad puede ser atribuida a su contenido de polifenoles, que probablemente actúan como captadores de radicales libres inhibiendo la oxidación de moléculas biológicas, entre ellas el ADN.

Con la finalidad de aportar conocimientos que permitan evaluar los componentes de la dieta como una medida preventiva del daño ocasionado por diversos factores ambientales fue necesario determinar si el EMC puede reducir la genotoxicidad y citotoxicidad producidas por la Dau. Cabe mencionar que la evaluación genotóxica se llevó a cabo con el mutágeno Dau, sin embargo al no estar actualmente disponible a la venta se optó por utilizar un análogo de ésta, la Dox, que se obtiene por un proceso de hidroxilación a partir de la Dau y tienen en común los mecanismos de acción.

El EMC mostró actividad antigenotóxica al disminuir la frecuencia de ENCMN desde las 48h hasta las 288 h con la dosis de 700 mg/kg. La Dox reveló un daño máximo (7



ENCMN/1000ENCM) a las 144 h, a ese mismo tiempo, las tres dosis mostraron inhibición de la frecuencia de ENCMN, misma que resultó estadísticamente significativa. La inhibición que produce el extracto va de 40 al 56% del daño que ocasiona 10mg/kg de Dox administrada a los animales del estudio y se puede observar que entre mayor es la dosis, mayor es la inhibición, lo que nos sugiere el efecto dosis-dependiente, excepto en el tiempo 240, cuya mayor inhibición ocurrió con la dosis intermedia del EMC. Estos resultados son congruentes con otros estudios realizados donde probaron el efecto antigenotóxico de extractos de granada, por técnicas diferentes a la utilizada en este estudio, por ejemplo Zahin et al evaluaron la fracción metanólica de un extracto de cáscara por medio del ensayo de Ames contra  $\text{NaN}_3$ , MMS, 2AF y BP induciendo mutagenicidad en *Salmonella typhimurium* (TA97, TA98, TA100 y TA102). La fracción no mostró signos de mutagenicidad pero si de actividad antimutagénica contra  $\text{NaN}_3$  y MMS de 66.76% a 91.86% de manera dosis-dependiente y contra 2AF y BP de 81.2 a 88.58%. En otro estudio en el que se probaron PG y AE aislados de un extracto de cáscara de granada, se encontró que estos compuestos antagonizan de manera marcada y dosis-dependiente el efecto de los mutágenos:  $\text{NaN}_3$ , MMS, BP y 2AF con inhibición máxima de mutagenicidad arriba del 90%. Presentan además efecto antiproliferativo profundo en células de cáncer de pulmón e inhiben los aductos de DNA inducidos por BP (74). Finalmente Negi *et al.* (58) evaluaron extractos de cáscara con diferentes solventes, acetato de etilo, acetona, etanol, metanol y agua, Todos ellos disminuyeron la mutagenicidad en *Salmonella typhimurium* cepas TA100 y TA1535. A 2500  $\mu\text{g}/\text{placa}$  todos los extractos mostraron una fuerte antimutagenicidad.

Una variedad de mecanismos puede jugar un papel vital en la actividad anti-mutagénica y anticancerígena de fitocompuestos. Estos mecanismos incluyen la inhibición de la proliferación celular, la modulación de la transducción de señales, de barrido de radicales libres, la inducción de enzimas de desintoxicación, la inducción de la detención del ciclo celular y la apoptosis, la modulación de las proteínas del citoesqueleto que juegan un papel clave en la mitosis, y la inhibición de la actividad de la topoisomerasa I o II (74).



## 7.5 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE *in vivo* POR DPPH<sup>•</sup> EN SUERO Y PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN HOMOGENEIZADO DE HÍGADO Y CORAZÓN

El estrés oxidativo se produce en las células como resultado de uno de tres factores: 1) un incremento en la generación de oxidantes, 2) un decremento en la protección antioxidante, o 3) una falla en la reparación del daño oxidativo. El daño celular es inducido por especies reactivas del oxígeno. Como se ha mencionado con anterioridad Dau y Dox provoca liberación de radicales libres provocando a su vez daño oxidativo; con la finalidad de elucidar el mecanismo de protección que fue determinado por la disminución en la frecuencia de ENCMN por el EMC en daño inducido con este fármaco se realizó la prueba de DPPH<sup>•</sup> en suero como un indicador de su capacidad antioxidante y TBARS para la determinación del grado de peroxidación lipídica por medio de la cuantificación de MDA, la peroxidación lipídica es un mecanismo establecido de daño celular y es utilizada como un indicador de estrés oxidativo en células y tejidos. Consiste en que las especies reactivas del oxígeno actúan sobre los lípidos de la membrana celular produciendo peróxidos lipídicos que son inestables y se descomponen para formar una serie de compuestos complejos incluyendo compuestos activos con átomos de carbono, como MDA. Este proceso, que daña a los ácidos grasos poliinsaturados, tiende a provocar un descenso de la fluidez de la membrana y conduce a una polimerización de los componentes de la membrana que puede ser transmitida a las sustancias vecinas como las proteínas de la membrana y del citoesqueleto.

Debido a que el mayor daño genotóxico de Dox se observó a las 144 h, se eligió este tiempo para realizar estas determinaciones en espera de encontrar de igual manera un mayor daño oxidativo. A este tiempo se encontró que las dosis utilizadas en los grupos de tratamiento (7, 70 y 700mg/kg) mostraron una inhibición de 22.5, 20.5 y 21.2% respectivamente, valores comparables con los observados en el grupo sin tratamiento, lo cual sugiere, que el EMC mantiene los niveles antioxidantes en suero. Se realizó otra determinación de DPPH<sup>•</sup> al tiempo 48, los resultados de la inhibición en los grupos de tratamiento a dosis de 7, 70 y 700mg/kg fueron de 46.3, 54.4 y 40.6% respectivamente, que representa aproximadamente el doble de la inhibición del tiempo anterior, además existe diferencia estadísticamente significativa con el testigo negativo, lo cual nos permite inferir que el EMC aumenta los niveles antioxidantes.

Los grupos positivo y negativo presentan valores similares en ambos tiempos, lo cual nos indica la reproducibilidad de la técnica, la diferencia radica en que al tiempo 48 los grupos de



tratamiento con EMC mostraron aumento significativamente mayor en la inhibición del radical que los grupos de tratamiento a las 144 h, esto puede ser explicado por que a este último tiempo se demostró un mayor daño ocasionado por Dox, por lo tanto mayor formación de radicales libres, que son contrarrestados por los antioxidantes del suero, conservando la actividad antioxidante a diferencia del tiempo 48 en el que los niveles de radicales libres son contrarrestados por los antioxidantes séricos, sin embargo prevalecen en suero aumentando la actividad antioxidante. Los resultados obtenidos coinciden con investigaciones en las que se reporta que la granada aumenta los niveles antioxidantes. Guo, *et al.* (53) demostraron utilizando el ensayo FRAP en un estudio en adultos mayores humanos que el jugo hecho de la pulpa de granada tiene una capacidad antioxidante superior que el jugo de manzana, encontrando que, tras la administración diaria durante 4 semanas de 250 ml del jugo, se incrementó la capacidad antioxidante en suero de 1.3 mmol a 1.46 mmol, mientras que los sujetos que consumieron jugo de manzana no experimentaron incrementos significativos en la capacidad antioxidante. En otro estudio llevado a cabo en ratón se demostró que los extractos de granada captan los radicales libres disminuyendo 19% el estrés oxidativo en macrófagos peritoneales y la peroxidación lipídica 42%, además de aumentar los niveles de glutatión reductasa en un 53%. Otra investigación en la que se reporta la disminución en la peroxidación lipídica corresponde a un estudio realizado en ratas con daño inducido al hígado con tetracloruro de carbono en el que se demostró que el pretratamiento con extracto de cáscara de granada causó un 54% de reducción de los valores de peroxidación lipídica comparados con el grupo control positivo (55).

En el presente estudio se realizó la primera determinación de peroxidación lipídica a las 144h, sin embargo los resultados no fueron indicativos de daño en ese tiempo, debido a que no existió diferencia significativa entre el grupo testigo y el tratado con Dox, considerando que el daño genotóxico ocurre después del daño a membrana celular, se optó por realizar el tiempo de muestreo a las 48h, a este tiempo tampoco se encontró daño que se reflejara en un aumento de los niveles de peroxidación lipídica. Lo anterior nos permite concluir que a estos tiempos de muestreo no existen suficientes agregados celulares acumulados de daño a nivel de lípidos, que puedan ser detectados por la técnica, ya que de acuerdo a Hicks *et al.* (82), el daño oxidativo presenta tres niveles, la adaptación, el daño agudo, que es menos intenso, debido a un desequilibrio menor, su expresión en cambios estructurales y funcionales, suele ser más



sutil que el proceso crónico, ya que generalmente es mediado por las ERO menos reactivas como el  $O_2^{\bullet-}$  y el  $H_2O_2$ , en cambio el crónico es un proceso mediado fundamentalmente por el  $HO^{\bullet}$ , se manifiesta por rompimiento o modificación de biomoléculas con la consecuente liberación de una segunda generación de productos de oxidación que a su vez son moléculas muy reactivas, amplificando y propagando el daño que se manifiesta como daño celular y tisular, inclusive se reflejan como cambios bioquímicos intracelulares y se manifiestan fundamentalmente por alteraciones funcionales locales y sistémicas. Por esta razón sería más recomendable evaluar la peroxidación lipídica al final del tratamiento crónico.

### 7.6 PURIFICACIÓN DEL PRINCIPIO ACTIVO

Se ha propuesto en algunos estudios, que la actividad de la granada pueden estar relacionada con los diversos componentes fenólicos presentes, incluyendo los isómeros de punicalagina, derivados de EA, y antocianinas (delfinidina, cianidina y pelargonidina 3-glucósido y 3,5-diglucósido), componentes conocidos por su capacidad de eliminar radicales libres e inhibir la oxidación lipídica *in vitro* (50, 195). Sin embargo Tzulker *et al.* (51) sugieren que la punicalagina de la cáscara es uno de los principales constituyentes fitoquímicos que contribuyen a la capacidad antioxidante total del jugo de granada, mientras que las antocianinas juegan solamente un rol menor en esta actividad. Por lo tanto, es importante llevar a cabo estudios para aislar el principio activo y evaluar su eficacia en un sistema de modelo animal. En otras investigaciones se ha logrado purificar y probar el efecto de componentes de la granada, en una de ellas se aisló AE y PC de jugo de granada y se probó su efecto contra tumores de colon, boca y próstata *in vitro*, los autores encontraron que el jugo tuvo una mejor actividad antiproliferativa de las líneas celulares, que los componentes purificados, lo que muestra los efectos multifactoriales y sinérgicos de los múltiples componentes, comparados con el ingrediente activo purificado. Zahin *et al.* (73) probaron diferentes fracciones de un extracto de cáscara de granada, obteniendo que la metanólica fue la que presentó los niveles antioxidantes más elevados y demostraron además actividad antimutagénica contra algunos xenobióticos. Posteriormente en otro estudio, aislaron los componentes de este extracto (AE y PC) y comprobaron su efecto antagonista y dosis-dependiente contra los mutágenos: azida de sodio, metil metano sulfonato benzopireno y 2-amino-fluoreno (74).



*Evaluación quimiopreventiva de la granada ( *Punica granatum L*) contra el daño producido por la doxorubicina*

## CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS



## VIII. CONCLUSIONES

- El EMC presentó una concentración de polifenoles y actividad antioxidante significativamente mayor a la del jugo de arilos con y sin semilla, el EBJ y el EMP.
- El EMC no presentó toxicidad letal hasta con 5g/kg en ratón macho CD1+ por vía intragástrica, tampoco genotoxicidad ni citotoxicidad en eritrocitos de sangre periférica durante 15 días de tratamiento.
- 70 y 700 mg/kg de EMC administrados por vía i.g. diariamente durante 15 días protegen 40-56% contra el daño clastogénico producido por la administración sistémica única de 10 mg/kg de Dox.
- 7, 70 y 700 mg/kg de EMC mantienen los niveles antioxidantes en suero en el tiempo de mayor daño clastogénico (144 h) ocasionado por la administración sistémica única de 10mg/kg de Dox.
- No se logró evidenciar el daño significativo en peroxidación lipídica a las 48 y 144 h.
- El espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de la elusión no. 10 de la cromatografía en columna sugiere la presencia de un compuesto glicosilado.

## IX. SUGERENCIAS

En vista de los resultados de este trabajo de investigación se propone como sugerencia continuar con el aislamiento y caracterización de los compuestos bioactivos del EMC. Además de la  $^1\text{H}$ -RMN sería pertinente incluir experimentos adicionales que conduzcan a la identificación, como lo son  $^{13}\text{C}$ -RMN, APT, COSY, NOESY, HETCOR, HMQC y HMBC. Con la finalidad de conocer las estructuras químicas y poder establecer una relación directa causa-efecto, se propone estandarizar los extractos en función del contenido del metabolito responsable del efecto benéfico y establecer la relación dosis-dependiente.

De igual manera podría realizarse un ensayo más de mutagenicidad como prueba complementaria, e incluir estudios sobre la expresión fenotípica y genotípica de algunas citosinas proinflamatorias con el fin de explicar los mecanismos moleculares de la actividad protectora encontrada.



*Evaluación quimiopreventiva de la granada (*Punica granatum* L) contra el daño producido por la doxorubicina*

## REFERENCIAS



## X. REFERENCIAS

1. Lansky EP, Newman RA. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *J Ethnopharmacol.* 2007;109(2):177-206.
2. Viuda-Martos M, Fernández-López J, Pérez-Álvarez J. Pomegranate and its many functional components as related to human health: a review. *Compr Rev Food Sci F.* 2010;9(6):635-54.
3. SAGARPA S. Secretaria de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación; servicio de información agroalimentaria y pesquera. 2007.
4. Galaverna G, Di Silvestro G, Cassano A, Sforza S, Dossena A, Drioli E, et al. A new integrated membrane process for the production of concentrated blood orange juice: Effect on bioactive compounds and antioxidant activity. *Food Chem.* 2008;106(3):1021-30.
5. Aviram M, Dornfeld L, Rosenblat M, Volkova N, Kaplan M, Coleman R, et al. Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Clin Nutr.* 2000;71(5):1062-76.
6. Tezcan F, Gültekin-Özgüven M, Diken T, Özçelik B, Erim FB. Antioxidant activity and total phenolic, organic acid and sugar content in commercial pomegranate juices. *Food Chem.* 2009;115(3):873-7.
7. Schwartz E, Tzulker R, Glazer I, Bar-Ya'akov I, Wiesman Z, Tripler E, et al. Environmental conditions affect the color, taste, and antioxidant capacity of 11 pomegranate accessions' fruits. *J Agr Food Chem.* 2009;57(19):9197-209.
8. Li Y, Guo C, Yang J, Wei J, Xu J, Cheng S. Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chem.* 2006;96(2):254-60.
9. Mirdehghan SH, Rahemi M. Seasonal changes of mineral nutrients and phenolics in pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit. *Sci Hortic.* 2007;111(2):120-7.
10. Jahfar M, Vijayan K, Azadi P. Studies on a polysaccharide from the fruit rind of *Punica granatum*. *Res J Chem Environ.* 2003;7(1):43-50.
11. Özgül-Yücel S. Determination of conjugated linolenic acid content of selected oil seeds grown in Turkey. *J Am Oil Chem Soc.* 2005;82(12):893-7.
12. Fadavi A, Barzegar M, Azizi M, Bayat M. Note. Physicochemical composition of ten pomegranate cultivars (*Punica granatum* L.) grown in Iran. *Food Sci Technol Int.* 2005;11(2):113-9.
13. Jurenka J. Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum* L.): a review. *Altern Med Rev J Clin Therap.* 2008;13(2):128-44.
14. El-Nemr S, Ismail I, Ragab M. Chemical composition of juice and seeds of pomegranate fruit. *Food/Nahrung.* 1990;34(7):601-6.
15. Syed DN, Malik A, Hadi N, Sarfaraz S, Afaq F, Mukhtar H. Photochemopreventive Effect of Pomegranate Fruit Extract on UVA-mediated Activation of Cellular Pathways in Normal Human Epidermal Keratinocytes. *Photochem Photobiol.* 2006;82(2):398-405.
16. Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernández-López J, Pérez-Alvarez J. Spices as functional foods. *Crit Rev Food Sci Nut.* 2010;51(1):13-28.



17. Soobrattee MA, Neergheen VS, Luximon-Ramma A, Aruoma OI, Bahorun T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. *Mutat Res-Fund Mol M.* 2005;579(1):200-13.
18. Marin F, Martinez M, Uribealago T, Castillo S, Frutos M. Changes in nutraceutical composition of lemon juices according to different industrial extraction systems. *Food Chem.* 2002;78(3):319-24.
19. Balasundram N, Sundram K, Samman S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.* 2006;99(1):191-203.
20. Afaq F, Saleem M, Krueger CG, Reed JD, Mukhtar H. Anthocyanin-and hydrolyzable tannin-rich pomegranate fruit extract modulates MAPK and NF- $\kappa$ B pathways and inhibits skin tumorigenesis in CD-1 mice. *Int J Cancer.* 2005;113(3):423-33.
21. Kong J-M, Chia L-S, Goh N-K, Chia T-F, Brouillard R. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry.* 2003;64(5):923-33.
22. Amakura Y, Okada M, Tsuji S, Tonogai Y. High-performance liquid chromatographic determination with photodiode array detection of ellagic acid in fresh and processed fruits. *J Chromatograph A.* 2000;896(1):87-93.
23. Poyrazoğlu E, Gökmen V, Artık N. Organic acids and phenolic compounds in pomegranates (*Punica granatum L.*) grown in Turkey. *Journal of food composition and analysis.* 2002;15(5):567-75.
24. Seeram N, Lee R, Hardy M, Heber D. Rapid large scale purification of ellagitannins from pomegranate husk, a by-product of the commercial juice industry. *Separation and purification technology.* 2005;41(1):49-55.
25. Seeram NP, Lee R, Heber D. Bioavailability of ellagic acid in human plasma after consumption of ellagitannins from pomegranate (*Punica granatum L.*) juice. *Clin Chim Acta.* 2004;348(1):63-8.
26. Seeram NP, Henning SM, Zhang Y, Suchard M, Li Z, Heber D. Pomegranate juice ellagitannin metabolites are present in human plasma and some persist in urine for up to 48 hours. *J Nutr.* 2006;136(10):2481-5.
27. González-Sarrías A, Larrosa M, Tomás-Barberán FA, Dolaro P, Espín JC. NF- $\kappa$ B-dependent anti-inflammatory activity of urolithins, gut microbiota ellagic acid-derived metabolites, in human colonic fibroblasts. *Br J Nutr.* 2010;104(04):503-12.
28. Bialonska D, Kasimsetty SG, Khan SI, Ferreira D. Urolithins, intestinal microbial metabolites of pomegranate ellagitannins, exhibit potent antioxidant activity in a cell-based assay. *J Agr Food Chem.* 2009;57(21):10181-6.
29. Seeram NP, Zhang Y, McKeever R, Henning SM, Lee R-p, Suchard MA, *et al.* Pomegranate juice and extracts provide similar levels of plasma and urinary ellagitannin metabolites in human subjects. *J Med Food.* 2008;11(2):390-4.
30. Cerdá B, Espín JC, Parra S, Martínez P, Tomás-Barberán FA. The potent in vitro antioxidant ellagitannins from pomegranate juice are metabolised into bioavailable but poor antioxidant hydroxy-6H-dibenzopyran-6-one derivatives by the colonic microflora of healthy humans. *Eur J Nut.* 2004;43(4):205-20.
31. Johanningsmeier SD, Harris GK. Pomegranate as a functional food and nutraceutical source. *Ann Rev Food Sci Technol.* 2011;2:181-201.
32. Naqvi S, Khan M, Vohora S. Anti-bacterial, anti-fungal and anthelmintic investigations on Indian medicinal plants. *Fitoterapia.* 1991;62:221-8.



33. Cáceres A, Girón LM, Alvarado SR, Torres MF. Screening of antimicrobial activity of plants popularly used in Guatemala for the treatment of dermatomucosal diseases. *J Ethnopharmacol.* 1987;20(3):223-37.
34. Prashanth D, Asha M, Amit A. Antibacterial activity of *Punica granatum*. *Fitoterapia.* 2001;72(2):171-3.
35. Braga L, Leite AA, Xavier KG, Takahashi J, Bemquerer M, Chartone-Souza E, et al. Synergic interaction between pomegranate extract and antibiotics against *Staphylococcus aureus*. *Can J Microbiol.* 2005;51(7):541-7.
36. Menezes SM, Cordeiro LN, Viana GS. *Punica granatum* (pomegranate) extract is active against dental plaque. *J Herb pharmacother.* 2006;6(2):79-92.
37. Aqil F, Ahmad I. Antibacterial properties of traditionally used Indian medicinal plants. Methods and findings in experimental and clinical pharmacology. 2007;29(2):79-92.
38. Das AK, Mandal SC, Banerjee SK, Sinha S, Das J, Saha B, et al. Studies on antidiarrhoeal activity of *Punica granatum* seed extract in rats. *J Ethnopharmacol.* 1999;68(1):205-8.
39. Mathabe M, Nikolova R, Lall N, Nyazema N. Antibacterial activities of medicinal plants used for the treatment of diarrhoea in Limpopo Province, South Africa. *J Ethnopharmacol.* 2006;105(1):286-93.
40. Dutta B, Rahman I, Das T. Antifungal activity of Indian plant extracts: Antimyzetische Aktivität indischer Pflanzenextrakte. *Mycoses.* 1998;41(11-12):535-6.
41. César de Souza Vasconcelos L, Sampaio MCC, Sampaio FC, Higino JS. Use of *Punica granatum* as an antifungal agent against candidosis associated with denture stomatitis. *Mycoses.* 2003;46(5-6):192-6.
42. Vasconcelos LCdS, Sampaio FC, Sampaio MCC, Pereira MdSV, Higino JS, Peixoto MHP. Minimum inhibitory concentration of adherence of *Punica granatum* Linn (pomegranate) gel against *S. mutans*, *S. mitis* and *C. albicans*. *Brazilian Dental Journal.* 2006;17(3):223-7.
43. Faria A, Monteiro R, Mateus N, Azevedo I, Calhau C. Effect of pomegranate (*Punica granatum*) juice intake on hepatic oxidative stress. *Eur J Nutr.* 2007;46(5):271-8.
44. Guo S, Deng Q, Xiao J, Xie B, Sun Z. Evaluation of antioxidant activity and preventing DNA damage effect of pomegranate extracts by chemiluminescence method. *J Agr Food Chem.* 2007;55(8):3134-40.
45. Zaid MA, Afaq F, Syed DN, Dreher M, Mukhtar H. Inhibition of UVB-mediated Oxidative Stress and Markers of Photoaging in Immortalized HaCaT Keratinocytes by Pomegranate Polyphenol Extract POMx. *Photochem Photobiol.* 2007;83(4):882-8.
46. de Nigris F, Balestrieri ML, Williams-Ignarro S, D'Armiento FP, Fiorito C, Ignarro LJ, et al. The influence of pomegranate fruit extract in comparison to regular pomegranate juice and seed oil on nitric oxide and arterial function in obese Zucker rats. *Nitric oxide.* 2007;17(1):50-4.
47. Naveena BM, Sen AR, Kingsly RP, Singh DB, Kondaiah N. Antioxidant activity of pomegranate rind powder extract in cooked chicken patties. *Int J Food Sci Tech.* 2008;43(10):1807-12.
48. Mousavinejad G, Emam-Djomeh Z, Rezaei K, Khodaparast MHH. Identification and quantification of phenolic compounds and their effects on antioxidant activity in pomegranate juices of eight Iranian cultivars. *Food Chem.* 2009;115(4):1274-8.



49. Noda Y, Kaneyuki T, Mori A, Packer L. Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: delphinidin, cyanidin, and pelargonidin. *Journal of Agricultural and Food Chem.* 2002;50(1):166-71.
50. Gil MI, Tomás-Barberán FA, Hess-Pierce B, Holcroft DM, Kader AA. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J Agr Food Chem.* 2000;48(10):4581-9.
51. Tzulker R, Glazer I, Bar-Ilan I, Holland D, Aviram M, Amir R. Antioxidant activity, polyphenol content, and related compounds in different fruit juices and homogenates prepared from 29 different pomegranate accessions. *J Agr Food Chem.* 2007;55(23):9559-70.
52. Rosenblat M, Volkova N, Coleman R, Aviram M. Pomegranate byproduct administration to apolipoprotein e-deficient mice attenuates atherosclerosis development as a result of decreased macrophage oxidative stress and reduced cellular uptake of oxidized low-density lipoprotein. *J Agr Food Chem.* 2006;54(5):1928-35.
53. Guo C, Wei J, Yang J, Xu J, Pang W, Jiang Y. Pomegranate juice is potentially better than apple juice in improving antioxidant function in elderly subjects. *Nutr Res.* 2008;28(2):72-7.
54. Schubert SY, Lansky EP, Neeman I. Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. *J Ethnopharmacol.* 1999;66(1):11-7.
55. Chidambara Murthy KN, Jayaprakasha GK, Singh RP. Studies on antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel extract using in vivo models. *J Agr Food Chem.* 2002;50(17):4791-5.
56. Çam M, Hışıl Y, Durmaz G. Classification of eight pomegranate juices based on antioxidant capacity measured by four methods. *Food Chem.* 2009;112(3):721-6.
57. Madrigal-Carballo S, Rodriguez G, Krueger C, Dreher M, Reed J. Pomegranate (*Punica granatum*) supplements: authenticity, antioxidant and polyphenol composition. *J Func Foods.* 2009;1(3):324-9.
58. Negi P, Jayaprakasha G. Antioxidant and antibacterial activities of *Punica granatum* peel extracts. *J Food Sci.* 2003;68(4):1473-7.
59. Medjakovic S, Jungbauer A. Pomegranate: a fruit that ameliorates metabolic syndrome. *Food Func.* 2013;4(1):19-39.
60. Nakajima A, Wada K, Katayama K, Saubermann L, Osawa E, Nagase H, et al. Gene expression profile after peroxisome proliferator activator receptor- $\gamma$  ligand administration in dextran sodium sulfate mice. *J Gastroenterol.* 2002;37(14):62-6.
61. Bassaganya-Riera J, DiGuardo M, Climent M, Vives C, Carbo A, Jouni ZE, et al. Activation of PPAR $\gamma$  and  $\delta$  by dietary puniceic acid ameliorates intestinal inflammation in mice. *Br J Nutr.* 2011;106(06):878-86.
62. Carlisle EM, Poroyko V, Caplan MS, Alverdy JA, Liu D. Gram negative bacteria are associated with the early stages of necrotizing enterocolitis. *PloS one.* 2011;6(3):e18084.
63. Coursodon-Boydiddle CF, Snarrenberg CL, Adkins-Rieck CK, Bassaganya-Riera J, Hontecillas R, Lawrence P, et al. Pomegranate seed oil reduces intestinal damage in a rat model of necrotizing enterocolitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2012;303(6):G744-G51.
64. Napoli C, Ignarro LJ. Nitric oxide and atherosclerosis. *Nitric oxide.* 2001;5(2):88-97.



65. Ignarro LJ, Byrns RE, Sumi D, de Nigris F, Napoli C. Pomegranate juice protects nitric oxide against oxidative destruction and enhances the biological actions of nitric oxide. *Nitric oxide*. 2006;15(2):93-102.
66. Ahmed S, Wang N, Hafeez BB, Cheruvu VK, Haqqi TM. *Punica granatum* L. extract inhibits IL-1 $\beta$ -Induced expression of matrix metalloproteinases by inhibiting the activation of MAP kinases and NF- $\kappa$ B in human chondrocytes in vitro. *J Nutr*. 2005;135(9):2096-102.
67. Lansky EP, Jiang W, Mo H, Bravo L, Froom P, Yu W, *et al*. Possible synergistic prostate cancer suppression by anatomically discrete pomegranate fractions. *Invest New Drugs*. 2005;23(1):11-20.
68. Albrecht M, Jiang W, Kumi-Diaka J, Lansky EP, Gommersall LM, Patel A, *et al*. Pomegranate extracts potently suppress proliferation, xenograft growth, and invasion of human prostate cancer cells. *J Med Food*. 2004;7(3):274-83.
69. Kim ND, Mehta R, Yu W, Neeman I, Livney T, Amichay A, *et al*. Chemopreventive and adjuvant therapeutic potential of pomegranate (*Punica granatum*) for human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2002;71(3):203-17.
70. Sánchez-Lamar A, Fonseca G, Fuentes JL, Cozzi R, Cundari E, Fiore M, *et al*. Assessment of the genotoxic risk of *Punica granatum* L.(Punicaceae) whole fruit extracts. *J Ethnopharmacol*. 2008;115(3):416-22.
71. Valadares MC, Pereira ERT, Benficia PL, Paula JR. Assessment of mutagenic and antimutagenic effects of *Punica granatum* in mice. *Braz J Pharm Sci*. 2010;46(1):121-7.
72. Seeram NP, Adams LS, Henning SM, Niu Y, Zhang Y, Nair MG, *et al*. *In vitro* antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *J Nutr Biochem*. 2005;16(6):360-7.
73. Zahin M, Aqil F, Ahmad I. Broad spectrum antimutagenic activity of antioxidant active fraction of *Punica granatum* L. peel extracts. *Mutat Res-Gen Toxicol En*. 2010;703(2):99-107.
74. Zahin M, Ahmad I, Gupta RC, Aqil F. Punicalagin and ellagic acid demonstrate antimutagenic activity and inhibition of benzo [a] pyrene induced DNA adducts. *BioMed Res Int*. 2014;2014.
75. Cortés RC. Evaluación de la actividad antioxidante de la naringina y de su capacidad antigenotóxica contra el daño producido por la daunorrubicina. México: Instituto Politécnico Nacional; 2002.
76. Mena S, Ortega A, Estrela JM. Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis. *Mutat Res-Gen Toxicol*. 2009;674(1):36-44.
77. Syed DN, Afaq F, Mukhtar H, editors. Pomegranate derived products for cancer chemoprevention. *Semin Cancer Biol*; 2007: Elsevier.
78. Oliveira PA, Colaço A, Chaves R, Guedes-Pinto H, De-La-Cruz P, Luis F, *et al*. Chemical carcinogenesis. *An Acad Bras Ciênc*. 2007;79(4):593-616.
79. Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Developmental biology*. 2007;302(1):1-12.
80. Riffel PGS. <https://conciertaciencia.wordpress.com/> [Octubre 2015 ].
81. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol*. 2004;142(2):231-55.



82. Hicks J, Torres-Ramos Y, Sierra-Vargas M. Estrés oxidante, concepto y clasificación. *Rev Endocrinol Nutr.* 2006;14(4):223-6.
83. Costaa LAD, Badawib A, El-Sohemya A. Nutrigenética y modulación del estrés oxidativo. *Ann Nutr Metab* 2012;60(3):27-36.
84. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(1):44-84.
85. Serafini M. The role of antioxidants in disease prevention. *Medicine.* 2006;34(12):533-5.
86. McCord JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med.* 2000;108(8):652-9.
87. Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem.* 2006;52(4):601-23.
88. Garcia-Bailo B, El-Sohemy A, Haddad PS, Arora P, BenZaied F, Karmali M, *et al.* Vitamins D, C, and E in the prevention of type 2 diabetes mellitus: modulation of inflammation and oxidative stress. *Biologics: targets & therapy.* 2011;5:7.
89. González-Torres MC, Betancourt-Rule M, Ortiz-Muñiz R. Daño oxidativo y antioxidantes. *Bioquímica.* 2000;25(1):3-9.
90. Brockmann H. Anthracyclines and anthracyclones.(Rhodomycinone, pyrromycinone and their glycosides). *Prog Chem Organic Nat Prod.* 1963;21:121.
91. Krohn K. Anthracycline Chemistry and Biology I: Biological Occurrence and Biosynthesis, Synthesis and Chemistry: Springer; 2009.
92. Cortés-Funes H, Coronado C. Role of anthracyclines in the era of targeted therapy. *Cardiovasc Toxicol.* 2007;7(2):56-60.
93. Malla S, Niraula NP, Singh B, Liou K, Sohng JK. Limitations in doxorubicin production from *Streptomyces peuceitius*. *Microbiol Res.* 2010;165(5):427-35.
94. Yang F, Teves SS, Kemp CJ, Henikoff S. Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. *BBA-Rev Cancer.* 2014;1845(1):84-9.
95. Pommier Y, Leo E, Zhang H, Marchand C. DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chem Biol.* 2010;17(5):421-33.
96. Thorn CF, Oshiro C, Marsh S, Hernandez-Boussard T, McLeod H, Klein TE, *et al.* Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet Genom.* 2011;21(7):440.
97. Gewirtz D. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol.* 1999;57(7):727-41.
98. Carpenter AJ, Porter AC. Construction, characterization, and complementation of a conditional-lethal DNA topoisomerase II $\alpha$  mutant human cell line. *Mol Biol Cell.* 2004;15(12):5700-11.
99. Wu C-C, Li T-K, Farh L, Lin L-Y, Lin T-S, Yu Y-J, *et al.* Structural basis of type II topoisomerase inhibition by the anticancer drug etoposide. *Science.* 2011;333(6041):459-62.
100. Nitiss JL. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(5):338-50.
101. Burgess DJ, Doles J, Zender L, Xue W, Ma B, McCombie WR, *et al.* Topoisomerase levels determine chemotherapy response *in vitro* and *in vivo*. *Proc Nat Acad Sci.* 2008;105(26):9053-8.



102. Swift LP, Rephaeli A, Nudelman A, Phillips DR, Cutts SM. Doxorubicin-DNA adducts induce a non-topoisomerase II-mediated form of cell death. *Cancer Res.* 2006;66(9):4863-71.
103. Pang B, Qiao X, Janssen L, Velds A, Groothuis T, Kerkhoven R, *et al.* Drug-induced histone eviction from open chromatin contributes to the chemotherapeutic effects of doxorubicin. *Nat Commun.* 2013;4:1908.
104. Sørensen BS, Sinding J, Andersen AH, Alsner J, Jensen PB, Westergaard O. Mode of action of topoisomerase II-targeting agents at a specific DNA sequence: uncoupling the DNA binding, cleavage and religation events. *J Mol Biol.* 1992;228(3):778-86.
105. Chaires JB, Herrera JE, Waring MJ. Preferential binding of daunomycin to 5'TACG and 5'TAGC sequences revealed by footprinting titration experiments. *Biochemistry.* 1990;29(26):6145-53.
106. Chen K-X, Gresh N, Pullman B. A theoretical investigation on the sequence selective binding of adriamycin to double-stranded polynucleotides. *Nucleic Acids Res.* 1986;14(5):2251-67.
107. Forrest RA, Swift LP, Rephaeli A, Nudelman A, Kimura K-I, Phillips DR, *et al.* Activation of DNA damage response pathways as a consequence of anthracycline-DNA adduct formation. *Biochem Pharmacol.* 2012;83(12):1602-12.
108. Taatjes DJ, Gaudiano G, Resing K, Koch TH. Alkylation of DNA by the anthracycline, antitumor drugs adriamycin and daunomycin. *J Med Chem.* 1996;39(21):4135-8.
109. Taatjes DJ, Gaudiano G, Resing K, Koch TH. Redox pathway leading to the alkylation of DNA by the anthracycline, antitumor drugs adriamycin and daunomycin. *J Med Chem.* 1997;40(8):1276-86.
110. L'Ecuyer T, Sanjeev S, Thomas R, Novak R, Das L, Campbell W, *et al.* DNA damage is an early event in doxorubicin-induced cardiac myocyte death. *Am J Physiol-Heart C.* 2006;291(3):H1273-H80.
111. Gajewski E, Gaur S, Akman SA, Matsumoto L, van Balgooy JN, Doroshow JH. Oxidative DNA base damage in MCF-10A breast epithelial cells at clinically achievable concentrations of doxorubicin. *Biochem Pharmacol.* 2007;73(12):1947-56.
112. De Beer EL, Bottone AE, Voest EE. Doxorubicin and mechanical performance of cardiac trabeculae after acute and chronic treatment: a review. *Eur J Pharmacol.* 2001;415(1):1-11.
113. Strigun A, Wahrheit J, Niklas J, Heinzle E, Noor F. Doxorubicin increases oxidative metabolism in HL-1 cardiomyocytes as shown by <sup>13</sup>C metabolic flux analysis. *Toxicol Sci.* 2012;125(2):595-606.
114. Torres VM, Simic VD. Doxorubicin-Induced Oxidative Injury of Cardiomyocytes-Do We Have Right Strategies for Prevention?: INTECH Open Access Publisher; 2012.
115. Kawase M, Watanabe M, Kondo T, Yabu T, Taguchi Y, Umehara H, *et al.* Increase of ceramide in adriamycin-induced HL-60 cell apoptosis: detection by a novel anti-ceramide antibody. *BBA-Mol Cell Biol.* 2002;1584(2):104-14.
116. Lucci A, Han TY, Liu YY, Giuliano AE, Cabot MC. Multidrug resistance modulators and doxorubicin synergize to elevate ceramide levels and elicit apoptosis in drug-resistant cancer cells. *Cancer.* 1999;86(2):300-11.



117. Delpy E, Hatem SN, Andrieu N, de Vaumas C, Henaff M, Rücker-Martin C, *et al.* Doxorubicin induces slow ceramide accumulation and late apoptosis in cultured adult rat ventricular myocytes. *Cardiovasc res.* 1999;43(2):398-407.
118. Chen Q, Denard B, Huang H, Ye J. Epigenetic silencing of antiviral genes renders clones of Huh-7 cells permissive for hepatitis C virus replication. *J Virol.* 2013;87(1):659-65.
119. Senchenkov A, Litvak DA, Cabot MC. Targeting ceramide metabolism—a strategy for overcoming drug resistance. *J Natl Cancer Inst.* 2001;93(5):347-57.
120. Ji C, Yang B, Yang Y, He S, Miao D, He L, *et al.* Exogenous cell-permeable C6 ceramide sensitizes multiple cancer cell lines to Doxorubicin-induced apoptosis by promoting AMPK activation and mTORC1 inhibition. *Oncogene.* 2010;29(50):6557-68.
121. Uchida Y, Itoh M, Taguchi Y, Yamaoka S, Umehara H, Ichikawa S-i, *et al.* Ceramide reduction and transcriptional up-regulation of glucosylceramide synthase through doxorubicin-activated Sp1 in drug-resistant HL-60/ADR cells. *Cancer Res.* 2004;64(17):6271-9.
122. Liu Y-Y, Yu JY, Yin D, Patwardhan GA, Gupta V, Hirabayashi Y, *et al.* A role for ceramide in driving cancer cell resistance to doxorubicin. *FASEB J.* 2008;22(7):2541-51.
123. Liu Y-y, Han T-y, Giuliano AE, CABOT MC. Ceramide glycosylation potentiates cellular multidrug resistance. *FASEB J.* 2001;15(3):719-30.
124. Liu Y-Y, Patwardhan GA, Bhinge K, Gupta V, Gu X, Jazwinski SM. Suppression of glucosylceramide synthase restores p53-dependent apoptosis in mutant p53 cancer cells. *Cancer Res.* 2011;71(6):2276-85.
125. Denard B, Lee C, Ye J. Doxorubicin blocks proliferation of cancer cells through proteolytic activation of CREB3L1. *Elife.* 2012;1:e00090.
126. Información para prescribir- Amplia IPP-A Adriablastina RD®, Solución Inyectable CDS (Nov 03, 2008)(No 727 ).
127. Escudero-Ortiz V, Ramón-López A, Duart MJ, Perez-Ruixo J, Valenzuela B. Farmacocinética poblacional de doxorubicina aplicada a la personalización de su dosificación en pacientes oncológicos. *Farm Hosp.* 2012;36(4):282-91.
128. Tardiff RG, Lohman PH, Wogan GN. Methods to assess DNA damage and repair: interspecies comparisons. 1994.
129. Heddle JA. A rapid in vivo test for chromosomal damage. *Mut Res-Fund Mol M.* 1973;18(2):187-90.
130. Schmid W. The micronucleus test. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects.* 1975;31(1):9-15.
131. Heddle JA, Hite M, Kirkhart B, Mavournin K, MacGregor JT, Newell GW, *et al.* The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity: A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology.* 1983;123(1):61-118.
132. Kirsch-Volders M, Sofuni T, Aardema M, Albertini S, Eastmond D, Fenech M, *et al.* Report from the in vitro micronucleus assay working group. *Mut Res-Gen Tox En.* 2003;540(2):153-63.
133. He S, Baker RS. Initiating carcinogen, triethylenemelamine, induces micronuclei in skin target cells. *Environ Mol Mutagen.* 1989;14(1):1-5.



134. Mavournin KH, Blakey DH, Cimino MC, Salamone MF, Heddle JA. The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Res-Rev Genet.* 1990;239(1):29-80.
135. Albertini RJ, Anderson D, Douglas GR, Hagmar L, Hemminki K, Merlo F, *et al.* IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutat Res-Rev Mutat.* 2000;463(2):111-72.
136. Fenech M. The *in vitro* micronucleus technique. *Mutat Res-Fund Mol M.* 2000;455(1):81-95.
137. Vanparys P, Vermeiren F, Sysmans M, Temmerman R. The micronucleus assay as a test for the detection of aneugenic activity. *Mutat Res Lett.* 1990;244(2):95-103.
138. Sullivan BA, Blower MD, Karpen GH. Determining centromere identity: cyclical stories and forking paths. *Nat Rev Genet.* 2001;2(8):584-96.
139. Goshima G, Kiyomitsu T, Yoda K, Yanagida M. Human centromere chromatin protein hMis12, essential for equal segregation, is independent of CENP-A loading pathway. *J cell biol.* 2003;160(1):25-39.
140. Schlegel R, MacGregor JT. The persistence of micronuclei in peripheral blood erythrocytes: detection of chronic chromosome breakage in mice. *Mutat Res Lett.* 1982;104(6):367-9.
141. Lähdetie J, Parvinen M. Meiotic micronuclei induced by X-rays in early spermatids of the rat. *Mutat Research-Fund Mol M.* 1981;81(1):103-15.
142. Cluet I, Fournier E, Melcion C, Cordier A. *In vivo* micronucleus test using mouse hepatocytes. *Mutat Res-Envir Muta.* 1989;216(6):321-6.
143. Cole R, Taylor N, Cole J, Arlett C. Short-term tests for transplacentally active carcinogens: I. Micronucleus formation in fetal and maternal mouse erythroblasts. *Mutat Res-Fund Molecular M.* 1981;80(1):141-57.
144. Fenech M, Morley AA. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res-Environ Muta.* 1985;147(1):29-36.
145. Ortiz R, Cortés E, González C, Pérez L, Betancourt M. Micronucleus frequency in spleen lymphocytes from severely malnourished rats during lactation. *Environ Mol Mutagen.* 1995;26(1):55-9.
146. Shindo Y, Hirano F, Maeda H, Takeda U. The micronucleus test with mouse spleen cells. *Mutat Res Lett.* 1983;121(1):53-7.
147. Hayashi M, Kodama Y, Awogi T, Suzuki T, Asita A, Sofuni T. The micronucleus assay using peripheral blood reticulocytes from mitomycin C-and cyclophosphamide-treated rats. *Mutat Res-Genet Tox.* 1992;278(2):209-13.
148. Hayashi M, MacGregor JT, Gatehouse DG, Adler ID, Blakey DH, Dertinger SD, *et al.* *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring. *Environ Mol Mutagen.* 2000;35(3):234-52.
149. Chaubey R, Bhilwade H, Joshi B, Chauhan P. Studies on the migration of micronucleated erythrocytes from bone marrow to the peripheral blood in irradiated Swiss mice. *Int J Radiat Biol.* 1993;63(2):239-45.
150. Salamone MF, Mavournin KH. Bone marrow micronucleus assay: a review of the mouse stocks used and their published mean spontaneous micronucleus frequencies. *Environ Mol Mutagen.* 1994;23(4):239-73.



151. Damodaran S, Parkin KL, Fennema OR. Fennema's food chemistry: CRC press; 2007.
152. Loraine S, Mendoza-Espinoza JA. Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México. Rev Mex Cienc Farm. 2010;41(4):18-27.
153. Doll R, Peto R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. J Natl Cancer Inst. 1981;66(6):1192-308.
154. Ames BN. Dietary carcinogens and anti-carcinogens. Clin Toxicol. 1984;22(3):291-301.
155. Surh Y-J, Ferguson LR. Dietary and medicinal antimutagens and anticarcinogens: molecular mechanisms and chemopreventive potential—highlights of a symposium. Mutat Res-Fund Mol M. 2003;523:1-8.
156. Stein C, Colditz G. Modifiable risk factors for cancer. Br J Cancer. 2004;90(2):299-303.
157. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic Biol Med. 1999;26(9):1231-7.
158. Walker RB, Everette JD. Comparative reaction rates of various antioxidants with ABTS radical cation. J Agr Food Chem. 2009;57(4):1156-61.
159. Brand-Williams W, Cuvelier M, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT-Food Sci Technol. 1995;28(1):25-30.
160. Singleton V, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. Am J Enol Vitic. 1965;16(3):144-58.
161. Aaby K, Skrede G, Wrolstad RE. Phenolic composition and antioxidant activities in flesh and achenes of strawberries (*Fragaria ananassa*). J Agr Food Chem. 2005;53(10):4032-40.
162. Nom NOM. 062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. 2001.
163. Lorke D. A new approach to practical acute toxicity testing. Arch Toxicol. 1983;54(4):275-87.
164. Chrzczanowicz J, Gawron A, Zwolinska A, de Graft-Johnson J, Krajewski W, Krol M, *et al.* Simple method for determining human serum 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity—possible application in clinical studies on dietary antioxidants. Clin Chem Lab Med. 2008;46(3):342-9.
165. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J biol Chem. 1951;193(1):265-75.
166. Buege JA, Aust SD. [30] Microsomal lipid peroxidation. Methods in enzymology. 1978;52:302-10.
167. Kaufman PB, Cseke LJ, Warber S, Duke JA, Brielmann HL. Natural products from plants: CRC Press Inc.; 1998.
168. José Elguero e Ibon Alkorta CP, Rosa M. Claramunt y María Dolores Santa María. Resonancia magnética de protón: aplicaciones en química orgánica.
169. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. Int J Biomed Sci. 2008;4(2):89.
170. Sen S, Chakraborty R, Sridhar C, Reddy Y, De B. Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: current status and future prospect. Int J Pharm Sci Rev Res. 2010;3(1):91-100.



171. Uttara B, Singh AV, Zamboni P, Mahajan R. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr Neuropharmacol*. 2009;7(1):65.
172. Ismail T, Sestili P, Akhtar S. Pomegranate peel and fruit extracts: a review of potential anti-inflammatory and anti-infective effects. *J Ethnopharmacol*. 2012;143(2):397-405.
173. Adhami VM, Khan N, Mukhtar H. Cancer chemoprevention by pomegranate: laboratory and clinical evidence. *Nutr Cancer*. 2009;61(6):811-5.
174. Bustos JS. Evaluación de la Actividad Antibacteriana de Extractos Orgánicos de los componentes de Árbol de granada (*Punica granatum* L.). Pachuca Hgo.: Universidad Autónoma del estado de Hidalgo; 2015.
175. Seeram NP, Aviram M, Zhang Y, Henning SM, Feng L, Dreher M, *et al*. Comparison of antioxidant potency of commonly consumed polyphenol-rich beverages in the United States. *J Agr Food Chem*. 2008;56(4):1415-22.
176. Sherwin E. Oxidation and antioxidants in fat and oil processing. *J Am Oil Chem Soc*. 1978;55(11):809-14.
177. Arabshahi-Delouee S, Urooj A. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. *Food Chem*. 2007;102(4):1233-40.
178. Fischer UA, Carle R, Kammerer DR. Thermal stability of anthocyanins and colourless phenolics in pomegranate (*Punica granatum* L.) juices and model solutions. *Food Chem*. 2013;138(2):1800-9.
179. Cerdá B, Llorach R, Cerón JJ, Espín JC, Tomás-Barberán FA. Evaluation of the bioavailability and metabolism in the rat of punicalagin, an antioxidant polyphenol from pomegranate juice. *Eur J Nutr*. 2003;42(1):18-28.
180. Mena P, Calani L, Dall'Asta C, Galaverna G, García-Viguera C, Bruni R, *et al*. Rapid and comprehensive evaluation of (poly) phenolic compounds in pomegranate (*Punica granatum* L.) juice by UHPLC-MSn. *Molecules*. 2012;17(12):14821-40.
181. Kang SH, Kwon JY, Lee JK, Seo YR. Recent advances in vivo genotoxicity testing: prediction of carcinogenic potential using comet and micronucleus assay in animal models. *J Cancer Prev*. 2013;18(4):277.
182. Patel C, Dadhaniya P, Hingorani L, Soni M. Safety assessment of pomegranate fruit extract: acute and subchronic toxicity studies. *Food Chem Toxicol*. 2008;46(8):2728-35.
183. Cristaldi M, Ieradi LA, Udroi I, Zilli R. Comparative evaluation of background micronucleus frequencies in domestic mammals. *Mutat Res-Gen Toxicol En*. 2004;559(1):1-9.
184. Kirsch-Volders M. Towards a validation of the micronucleus test. *Mutat Res-Gen Toxicol En*. 1997;392(1):1-4.
185. Parry JM, Sors A. The detection and assessment of the aneuploidic potential environmental chemicals: the European Community Aneuploidy Project. *Mutat Res-Fund Mol M*. 1993;287(1):3-15.
186. Serke S, Huhn D. Identification of CD71 (transferrin receptor) expressing erythrocytes by multiparameter-flow-cytometry (MP-FCM): correlation to the quantitation of reticulocytes as determined by conventional microscopy and by MP-FCM using a RNA-staining dye. *Br J Haematol*. 1992;81(3):432-9.



187. Torous DK, Dertinger SD, Hall NE, Tometsko CR. Enumeration of micronucleated reticulocytes in rat peripheral blood: a flow cytometric study. *Mutat Res-Gen Toxicol En.* 2000;465(1):91-9.
188. Oliveira-Martins C, Grisolia C. Determination of micronucleus frequency by acridine orange fluorescent staining in peripheral blood reticulocytes of mice treated topically with different lubricant oils and cyclophosphamide. *Genet Mol Biol.* 2007;6:566-74.
189. Purves D, Harvey C, Tweats D, Lumley CE. Genotoxicity testing: current practices and strategies used by the pharmaceutical industry. *Mutagenesis.* 1995;10(4):297-312.
190. Sahu SC, Gray GC. Pro-oxidant activity of flavonoids: effects on glutathione and glutathione S-transferase in isolated rat liver nuclei. *Cancer Lett.* 1996;104(2):193-6.
191. Yoshino M, Haneda M, Naruse M, Murakami K. Prooxidant activity of flavonoids: copper-dependent strand breaks and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA. *Mol Genet Metab.* 1999;68(4):468-72.
192. Cariño-Cortés R, Álvarez-González I, Martino-Roaro L, Madrigal-Bujaidar E. Effect of naringin on the DNA damage induced by daunorubicin in mouse hepatocytes and cardiocytes. *Biol Pharm Bull.* 2010;33(4):697-701.
193. Boriollo MFG, Resende MR, Silva TAd, Públio JY, Souza LS, Dias CTdS, *et al.* Evaluation of the mutagenicity and antimutagenicity of *Ziziphus joazeiro* Mart. bark in the micronucleus assay. *Genetics and Mol Biol.* 2014;37(2):428-38.
194. González RIÁ. Efecto inhibitorio del jugo de toroja sobre la genotoxicidad producida por la Ifosfamida y la Daunorubicina. Mexico D.F.: Instituto Politécnico Nacional; 2004.
195. Noda Y, Kaneyuki T, Mori A, Packer L. Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: delphinidin, cyanidin, and pelargonidin. *J Agr Food Chem.* 2002;50(1):166-71.

